

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA CEFTRIAXONA ENCAPSULADA EM
LIPOSSOMAS CONTRA ESTIRPES CLÍNICAS ISOLADAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA COM
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

RITA ALEXANDRA CORREIA DIOGO

ORIENTADOR(A):

Doutora Sandra Isabel Rodrigues de Aguiar

COORIENTADOR(A):

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves

Gil Neves

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA CEFTRIAXONA ENCAPSULADA EM
LIPOSSOMAS CONTRA ESTIRPES CLÍNICAS ISOLADAS DE ANIMAIS DE COMPANHIA COM
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

RITA ALEXANDRA CORREIA DIOGO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

VOGAIS:

Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da
Silva
Doutora Sandra Isabel Rodrigues de Aguiar

ORIENTADOR(A):

Doutora Sandra Isabel Rodrigues de Aguiar

COORIENTADOR(A):

Doutora Solange Judite Roque Coelho Alves
Gil Neves

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE

Nome: Rita Alexandra Correia Diogo

Título da Tese ou
Dissertação: Atividade antimicrobiana *in vitro* da ceftriaxona encapsulada em lipossomas
contra estirpes clínicas isoladas de animais de companhia com diagnóstico de
infecção do trato urinário

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas
públicas): 2021

Designação do curso
de Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☐ Produção Animal e Segurança Alimentar
☐ Morfologia e Função ☒ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 23 de fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Rita Diogo

Agradecimentos

Primeiramente, agradecer à Dra. Sandra Aguiar por me ter aceitado como orientanda sem, sequer, me conhecer. Não vou esquecer todo o apoio, desde o primeiro dia, num meio que desconhecia. Obrigada pela paciência, simpatia e todos os conhecimentos transmitidos durante o tempo que estive no laboratório e em todo o processo de escrita desta dissertação.

Agradecer à Professora Solange Gil por ter aceitado ser minha coorientadora, pela paciência, disponibilidade e apoio durante os meses de estágio. Obrigada por ser um exemplo de profissionalismo e pela dedicação aos seus estagiários.

A toda a equipa da UICB, especialmente à Dra. Inês Machado e Dra. Eva Cunha pela ajuda e ensinamento, especialmente pela oportunidade de praticar, sem restrições. À Enfermeira Carla Pardal e da Auxiliar Técnica Jú Silva pela ajuda e ensinamentos.

Às minhas colegas estagiárias Raquel Veloso, Daniela Rebelo e, especialmente, à minha amiga Viviana Santos, que para além de colega foi uma grande compincha ao longo deste período. Pelo trabalho de equipa e apoio, pelas gargalhadas e horas de almoço partilhadas.

Um agradecimento a toda a equipa do laboratório, Dr. Frederico Silva, Dra. Joana Dias, Ana, Sara, e especialmente à Marta, por ter sido uma grande ajuda nos momentos de desespero. Obrigada por me fazerem sentir parte da equipa e por toda a ajuda e conselhos ao longo do trabalho laboratorial.

À Dra. Carla Carneiro e à Professora Manuela Oliveira pela cedência das estirpes clínicas para o presente estudo. E à Dra. Manuela Gaspar e Dra. Magda Ferreira por me terem recebido no seu laboratório e terem passado todos os conhecimentos sobre lipossomas.

A todos os meus amigos, em particular, Carolina, Maria João, Rute, Barão, Viviana, Rita Vinha, Rita Silva, Rita Rodrigues, Inês Freitas, Pedro Costa e Jorge Silva. Durante esta jornada ouviram os meus queixumes, as minhas piadas e as minhas irritações com o mundo.

Não posso esquecer o agradecimento ao meu cão, o Pucci. Por fim, é tempo de agradecer aos membros da família que sempre estiveram presentes. Mas o agradecimento especial vai para a minha mãe e para o meu irmão, que suportaram 6 anos de alguns gritos, desespero, mau humor e irritações várias. Sem eles nada disto seria possível. Um agradecimento final para mim, por nunca ter desistido ou vacilado durante estes 6 anos.

Resumo

Atividade antimicrobiana *in vitro* da ceftriaxona encapsulada em lipossomas contra estirpes clínicas isoladas de animais de companhia com diagnóstico de infecção do trato urinário

As infecções do trato urinário ocorrem de forma frequente, na prática clínica veterinária, sendo responsáveis pela utilização de antibióticos no seu tratamento. O recurso excessivo a estes fármacos, tanto na medicina veterinária como na medicina humana, tem levado ao desenvolvimento e aumento das resistências antimicrobianas. Como consequência, ocorreu uma diminuição dos antibióticos disponíveis e eficazes para o tratamento de infecções bacterianas, transformando-se numa problemática a nível global. Perante esta situação, têm sido desenvolvidas novas abordagens ao tratamento de infecções bacterianas, que se têm vindo a demonstrar eficazes e promissoras, sendo uma delas o encapsulamento de antibióticos em lipossomas. No presente estudo, foi avaliada e comparada a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da ceftriaxona livre e encapsulada em lipossomas, contra 13 estirpes clínicas de animais de companhia hospitalizados na Unidade de Isolamento e Controlo Biológico com diagnóstico confirmado de infecção do trato urinário. A ceftriaxona foi encapsulada em lipossomas com propriedades fusogénicas e uma composição lipídica PC:DOPE:CHEMS (rácio molar 4:4:2), com uma eficácia de encapsulação de 6%. A atividade antimicrobiana, da ceftriaxona lipossomal e livre, foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória, pelo método de microdiluição em placa. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito antimicrobiano da ceftriaxona encapsulada foi inferior ao da ceftriaxona livre, tanto para as estirpes classificadas como suscetíveis como para as MDR. Embora a formulação lipossomal utilizada neste estudo tenha características fusogénicas, o que lhe permite uma melhor interação com as bactérias, a eficácia de encapsulação demonstrou-se baixa, o que pode explicar estes resultados. Em suma, a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da formulação lipossomal não apresentou um desempenho superior, quando comparada com a formulação livre. Contudo, a formulação lipossomal com propriedades fusogénicas demonstrou efeito antibacteriano contra algumas estirpes. Como perspetiva futura, as características fusogénicas da formulação lipossomal devem ser preservadas, para que a interação entre lipossoma e bactéria se mantenha, mas será necessário aumentar a eficácia de encapsulação.

Palavras-Chave: infecção do trato urinário, resistência antimicrobiana, ceftriaxona, lipossomas

Abstract

***In vitro* antimicrobial activity of ceftriaxone encapsulated in liposomes against clinical strains isolated from companion animals diagnosed with urinary tract infection**

In the veterinary clinical practice, urinary tract infections occur frequently and are responsible for the use of antibiotics in their treatment. The excessive use of these drugs, both in veterinary and human medicine, has led to the development and increase of antimicrobial resistance. Consequently, there was a decrease in available and effective antibiotics for the treatment of bacterial infections, becoming a global issue. Towards this situation, new approaches to the treatment of infections were developed, which have been showing a promising effect and promising, one of which is the encapsulation of antibiotics in liposomes. In the present study, the *in vitro* antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated ceftriaxone was evaluated and compared against 13 clinical strains isolated from companion animals hospitalized in the Isolation and Biological Unit with confirmed diagnosis of urinary tract infection. Ceftriaxone was encapsulated in liposomes with fusogenic properties and PC:DOPE:CHEMS were the lipids of its composition (molar ratio 4:4:2), with an encapsulation efficiency of 6%. The antimicrobial activity of liposomal and free ceftriaxone was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration, using the microdilution plate method. The results obtained demonstrated that the antimicrobial effect of encapsulated ceftriaxone was less than that of free ceftriaxone, both for susceptible and for the MDR strains. Although the liposomal formulation used in this study has fusogenic characteristics, which allows it to better interact with bacteria, the encapsulation efficiency was shown to be low, which may explain these results. To sum up, the *in vitro* antimicrobial activity of liposome-encapsulated ceftriaxone did not show a superior performance, when compared to the free formulation. However, the liposomal formulation with fusogenic properties demonstrated antibacterial efficiency against some strains. As a future perspective, the fusogenic characteristics of the liposomal formulation must be preserved, so that the interaction between liposome and bacteria is maintained, but it will be necessary to increase the encapsulation efficiency.

Keywords: urinary tract infection, antimicrobial resistance, ceftriaxone, liposomes

Índice

1. Relatório das Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular	1
1.1. Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas	1
1.2. Laboratório de Microbiologia, Farmacologia e Toxicologia	2
2. Introdução.....	4
2.1. Resistência aos Antibióticos: uma ameaça à saúde global.....	4
2.2. Infecção do Trato Urinário	5
2.2.1 Cistite Bacteriana Esporádica	6
2.2.2 Cistite Bacteriana Recorrente.....	7
2.2.3 Bacteriúria Subclínica	9
2.2.4 Infecção do Trato Urinário Superior - Pielonefrite	10
2.3 Bactérias Alvo do Presente Estudo.....	11
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
2.3.2 <i>Klebsiella Pneumoniae</i>	13
2.4 Terapêutica Antimicrobiana	14
2.4.1 Cefalosporinas	15
2.5 Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos	17
2.5.1 Método de Difusão	18
2.5.2 Método de Diluição.....	19
2.6 Resistências aos Antibióticos	19
2.6.1 Resistência Intrínseca.....	20
2.6.2 Resistência Adquirida.....	21
2.7 Novas Abordagens Terapêuticas - Lipossomas.....	22
2.7.1 Propriedades Físico-Químicas dos Lipossomas	25
2.7.2 Classificação dos lipossomas.....	26
2.7.3 Interação entre Lipossoma e Bactérias	28
2.7.4 Vias de administração.....	29
2.7.5 Método de preparação	29
3. Parte Prática	30
3.1 Objetivo de Estudo	30
3.2 Materiais e Métodos.....	32
3.2.1 Recolha de Dados e Amostra	32
3.2.2 Evolução das Curvas de Crescimento.....	33
3.2.3 Preparação dos Lipossomas: incorporação ativa	34
3.2.4 Teste de suscetibilidade aos antibióticos	36
3.2.5 Validação do método AlamarBlue.....	39
3.3 Resultados e Discussão	40
3.3.1 Caracterização da população hospitalizada na UICB com infecção bacteriana com suspeita de multirresistência.....	40

3.3.2 Caracterização da amostra hospitalizada na UICB com ITU	44
3.3.3 Avaliação das Curvas de Crescimento	49
3.3.4 Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos: método de microdiluição em placa	51
4. Conclusão	63
5. Referências Bibliográficas	66
6. Anexos	76
6.1 Tabelas	76
6.2 Comunicação oral no XVI Congresso Internacional Veterinário Montenegro em 21 e 22 de fevereiro de 2020	85
6.3 Submissão do <i>Abstract</i> para o 31º ECCMID 2021 (9-12 julho), Viena – Áustria ...	87

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de resistência intrínseca (esq) e adquirida (drt). Adaptado de Levy and Bonnie 2004.....	19
Figura 2: Representação esquemática de um lipossoma unilamelar e os seus componentes. Adaptado de (Banerjee et al. 2015).	24
Figura 3: Classificação dos lipossomas segundo tamanho e número de camadas. Adaptado de Alhariri et al. 2013.	26
Figura 4: Representação esquemática dos quatro principais tipos de lipossomas: convencionais, longa circulação, imunolipossomas e catiónicos. Adaptado de (Storm and Crommelin 1998).....	28
Figura 5: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de interação possíveis entre um lipossoma e bactéria alvo. Adaptado de (Alhariri et al. 2013).	28
Figura 6: Representação esquemática da disposição das formulações lipossomal e livre, nas diferentes concentrações, na placa de microdiluição.....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Definições aplicadas aos diferentes tipos de infeções do trato urinário recorrentes. Adaptado de Sykes and Westropp 2013.	8
Tabela 2: Classificação das cefalosporinas por gerações (descoberta cronológica): espectro de ação e exemplos (Prescott 2013; Devansh and Kumar 2015).	16
Tabela 3: Alternativas terapêuticas à utilização dos antibióticos: definição e exemplos práticos de utilização.	23
Tabela 4: Informação relativa aos animais (espécie, género, idade, tipo de infeção, estirpes isoladas, antibioterapia utilizada, desfecho do caso clínico e follow-up) dos quais foram obtidas as amostras de urina de onde foram possíveis isolar as estirpes clínicas testadas no presente estudo.	33
Tabela 5: Resumo das principais características físico-químicas dos lipossomas com propriedades fusogénicas, desenvolvidos através do método de incorporação ativa.	34
Tabela 6: Valores de absorvância (241 nm) da solução de CTX, correspondente média e desvio padrão para cada padrão definido (P1-P6), para formulação da reta de calibração na quantificação da ceftriaxona.	36
Tabela 7: Diluições a semear, para contagem de UFC em placa, pelo método de espalhamento, para cada checkpoint (T0-T9).	40
Tabela 8: Categorização (por grupo) das idades dos animais internados na UICB (N=21) com infeção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR.....	41
Tabela 9: Agentes infecciosos responsáveis pelas infeções bacterianas dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21).	43

Tabela 10: Género e espécie dos novos casos (N=13) de ITU, hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020).	45
Tabela 11: Categorização (por grupo) das idades dos animais internados (Total de casos - 33; Novos casos - 13) na UICB com ITU (jan2019 – jan2020).	46
Tabela 12: Agentes infecciosos causadores de ITU nos novos casos (N=13) hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020).	47
Tabela 13: Alterações, após o TSA, à antibioterapia instituída aos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB com ITU (N=33).	49
Tabela 14: Valores da CMI, obtidos através da viabilidade celular, correspondentes a cada formulação (livre e lipossomal) para cada estirpe clínica suscetível testada.	53
Tabela 15: Valores da CMI, obtidos através da viabilidade celular, correspondentes a cada formulação (livre e lipossomal) para cada estirpe clínica MDR testada.	59

Lista de Equações

Equação 1: Cálculo da Viabilidade Celular: Tratado Vs. Não tratado.	38
Equação 2: Cálculo das Unidades Formadoras de Colónias por mililitro.	40

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Desenho de Estudo: representação esquemática das diferentes etapas do presente estudo, por ordem cronológica do seu desenvolvimento.	32
Gráfico 2: Reta de calibração para quantificação da ceftriaxona na formulação lipossomal, através da medição da absorvância (abs) a 241 nm.	36
Gráfico 3: Distribuição dos novos casos de infeção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21), hospitalizados na UICB, por género. e espécie.	41
Gráfico 4: Distribuição das idades dos animais hospitalizados (jan2019 – jan2020) na UICB com infeção bacteriana com critério de MDR (N=21).	42
Gráfico 5: Tipos de infeção na população de animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com infeção bacteriana com critério de MDR. (N=21).	42
Gráfico 6: Classificação da resistência dos agentes etiológicos responsáveis pelas infeções bacterianas dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com critério de MDR.	43
Gráfico 7: Antibioterapia empírica aplicada no tratamento dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com infeção bacteriana com critério de MDR (N=21).	44
Gráfico 8: Desfecho Clínico dos animais hospitalizados na UICB com infeção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21).	44
Gráfico 9: Distribuição dos casos de ITU, hospitalizados na UICB (out2013 – jan2020), por género e espécie (N=33).	45
Gráfico 10: Classificação da origem da ITU, por espécie, nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB (N=33).	45
Gráfico 11: Agentes bacterianos causadores de ITU nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB (N=33).	47
Gráfico 12: Classificação da resistência dos agentes etiológicos isolados causadores de ITU nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB.	47
Gráfico 13: Antibioterapia empírica instituída aos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB com ITU (N=33).	48
Gráfico 14: Desfecho clínico e follow-up dos animais internados na UICB (out2013 – jan2020) com ITU (N=33).	49
Gráfico 15: Curvas de crescimento das estirpes selecionadas, desenvolvidas ao longo de 6 horas, com medição dos valores da DO (600 nm) a cada hora.	50
Gráfico 16: Comparação entre a os valores da densidade óptica a 600 nm (tracejado laranja), quantificação da viabilidade celular com recurso ao AlamarBlue (Tratado Vs. Controlo - %; tracejado azul) e UFC/mL (círculos cinzentos) ao longo dos 9 checkpoints estabelecidos.	52

Gráfico 17: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes suscetíveis testadas, quando submetidos às diferentes concentrações (seriadas 1:2 - 24 µg/mL a 0,09 µg/mL) das formulações livre e lipossomal de CTX.	52
Gráfico 18: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes MDR testadas, quando submetidos às diferentes concentrações (seriadas 1:2 - 24 µg/mL a 0,09 µg/mL) das formulações livre e lipossomal de CTX.....	57
Gráfico 19: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes suscetíveis e MDR, quando submetidas à concentração mais elevada (24 µg/mL) da formulação lipossomal vazia (Lípidos constituintes + Tampão).....	63

Lista de Abreviaturas

AB – Antibiótico

Abs – Absorvância

AMC – Associação Amoxicilina e Ácido Clavulânico

API – Analytical Profile Index (Índice Analítico de Perfil)

ATCC – American Type Culture Collection

CHEMS – Cholesteryl Hemisuccinate (Hemissuccinato de Colesterila)

Chol – Cholesterol (Colesterol)

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CTX – Ceftriaxona

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DGS – Direção-Geral da saúde

DMPG – Dimyristoyl phosphatidylglycerol (Dimiristoil Fosfatidilglicerol)

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

DO – Densidade Óptica

DOTAP – Dioleoyl Trimethylammonium-Propame (Dioleoil Trimetilamónio-Propano)

DPPC – Dipalmitoylphosphocholine (Dipalmitoilfosfocolina)

DRV – Dehydration-Rehydration Vesicles (Vesículas de Desidratação-Reidratação)

E – Coeficiente de extinção molar

EE – Eficácia de Encapsulação

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ESBL – Extended-Spectrum β -Lactamases (β -lactamases de espectro alargado)

EUCAST - European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FeLV – Feline Leukemia Virus (Vírus da Leucemia Felina)

FIV – Feline Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Felina)

FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa

GUV – Giant Unilamellar Vesicles (Vesículas Unilamelares Gigantes)
 HEV – Hospital Escola Veterinário
 ISCAID – International Society for Companion Animal Infectious Diseases
 ITU – Infecção do Trato Urinário
 Jan – Janeiro
 LB – Luria-Bertani Broth (Meio de cultura)
 LCR – Líquido Cefalorraquidiano
 LIP – Lipossoma
 LPS – Lipopolissacarídeo
 LUV – Large Unilamellar Vesicles (Vesículas Unilamelares Grandes)
 MBL – Metallo- β -lactamases
 MED - Média
 MDR – Multi-drug Resistant (Multi-resistente a antibióticos)
 MIMV – Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
 MLV – MultiLamellar Vesicles (Vesículas Multilamelares)
 MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)
 OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
 Out – Outubro
 PBP – Penicillin-Binding Proteins (Proteínas específicas de ligação à penicilina)
 PC – Phosphatidylcholine (Fosfatidilcolina)
 PCR - Polymerase chain reaction
 PDR – Pandrug Resistance
 PEG – Polyethylene glycol (Polietilenoglicol)
 PG – Phosphatidylglycerol (Fosfatidilglicerol)
 PIF – Peritonite Infeciosa Felina
 PNCRAM – Programa Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos
 POPC – Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (Palmitoil-oleil-fosfatidilcolina)
 REV – Reverse-phase Evaporation Vesicles (Vesícula de Evaporação de Fase-reversa)
 SD – Desvio Padrão
 SDMA – Symmetric Dimethylarginine (Dimetilarginina Simétrica)
 SRE – Sistema Reticulo-Epitelial
 SUV - Small Unilamellar Vesicles (Vesículas Unilamelares Pequenas)
 Tc – Temperatura de Fase de Transição
 THG – Transferência Horizontal de Genes
 TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos
 TSB - Tryptic Soy Broth (Meio de cultura)

UICB – Unidade de Isolamento e Contenção Biológica

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

XDR – Extreme Drug Resistance

1. Relatório das Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, que serviu de base para esta dissertação, foi realizado nas áreas de Clínica de Animais de Companhia, Sanidade Animal, Microbiologia, Farmacologia e Toxicologia, repartido entre dois locais diferentes, o que totalizou 950 horas. A primeira parte decorreu na Unidade de Isolamento e Contenção Biológica (UICB) do Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV FMV-ULisboa), sob a orientação da Professora Doutora Solange Gil, Dr^a Inês Machado e Dr^a Eva Cunha, entre os dias 2 de setembro e 31 de dezembro de 2019. A segunda parte decorreu no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária, sob a orientação da Dra. Sandra Aguiar, em dois períodos, devido à situação de estado de emergência decretado por causa da Pandemia. Esses períodos decorreram entre 8 de janeiro e 13 de março de 2020 e de 1 a 30 de junho de 2020. Durante este último período de estágio, ainda me desloquei ao Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galénica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para o desenvolvimento de uma parte do trabalho prático, com o auxílio e supervisão da Doutora Maria Manuela Gaspar e da Dr^a Magda Ferreira.

1.1. Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas

A Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas é uma valência do HEV da FMV-UL. Durante os meses de estágio na UICB assisti e participei na rotina de internamento deste local, sendo que, dela fazem parte monitorizações e medicações bi-diárias dos animais hospitalizados, colheita e entrega de amostras (fezes, urina, sangue, zaragatoas orais), acompanhamento dos animais durante os exames complementares de diagnóstico (exemplo: raio-X, ecografia, TAC, pequena cirurgia) e registo informático detalhado das informações diárias de cada paciente nos programas de registo hospitalar, nomeadamente Guruvet e Pet Universal. Também colaborei nas consultas de especialidade de doenças infecciosas (acompanhamento e referência), que decorrem na UICB durante a semana, e nas consultas de vacinação, aos sábados no HEV. Nestas consultas desempenhei tarefas como aquisição e registo da anamnese, exame físico, contenção física, cuidados básicos de saúde e acompanhamento dos animais e tutores durante os exames complementares de diagnóstico.

Durante este período, acompanhei mais de 100 casos de animais com diagnóstico ou suspeita de doença infecciosa, durante um total de 630 horas. Várias foram as doenças com que contactei, podendo aprender e discutir sobre as características da doença, os possíveis meios de diagnóstico e tratamentos. De entre todas as doenças as mais expressivas foram a parvovirose canina, leptospirose, panleucopénia felina, coronavírus felino/peritonite infecciosa felina (PIF), vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), complexo da doença do trato respiratório superior, infeções multirresistentes do trato urinário,

respiratório e pele. Como forma de registo, a UICB tem uma base de dados atualizada regularmente, também pelos estagiários, que contempla os dados relativos a todos os animais internados nas suas instalações desde o início da sua atividade (2013) e a sua respetiva doença.

No final de cada mês, cada estagiário apresentou detalhadamente um caso clínico que tivesse ocorrido nesse mês ou da base de dados, de forma a fomentar a apresentação oral, discussão de casos clínicos e um estudo aprofundado da doença apresentada.

Para além das tarefas ligadas à prática clínica, na UICB, cada indivíduo é responsável pela correta utilização dos equipamentos de proteção individual (EPI) como luvas, máscara facial, bata descartável, touca descartável e proteção de calçado nas zonas destinadas ao isolamento dos animais. Enquanto estagiária, fui responsável pela reposição deste material no interior das salas de isolamento, assim como pela desinfecção das superfícies e materiais não descartáveis que se encontram tanto no interior dessas salas como nos espaços comuns, com a ajuda e supervisão da auxiliar Maria de Jesus.

É de salientar que a UICB está integrada no programa das unidades curriculares de “Atividades Hospitalares” e “Doenças Infeciosas” dos alunos do MIMV dos 3º, 4º e 5º ano. Como estagiários, a nossa função passa por acompanhar e supervisionar estes alunos durante as tarefas desenvolvidas no decorrer das aulas práticas.

Ao longo de todo este período, recolhi e organizei os casos clínicos e toda a informação necessária para desenvolver o estudo apresentado nesta dissertação.

1.2. Laboratório de Microbiologia, Farmacologia e Toxicologia

O trabalho prático necessário para o desenvolvimento da presente dissertação de mestrado foi desenvolvido ao longo de 4 meses no laboratório de microbiologia, farmacologia e toxicologia, o que totalizou, aproximadamente, 320 horas de trabalho laboratorial.

Durante as três semanas iniciais, com recurso à base de dados da UICB, pesquisei de entre todos os casos clínicos, os animais com diagnóstico de infeção bacteriana desde outubro de 2013 até janeiro de 2020. Desta forma, reuni esses casos num banco de dados mais restrito, permitindo avaliar qual a infeção mais frequente e em quais as amostras viáveis para serem testadas. Seguiu-se a recolha das amostras, a serem utilizadas no presente estudo, que se encontravam armazenadas no Laboratório de Bacteriologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária.

Após concluir a organização da informação, iniciei o trabalho laboratorial. As primeiras semanas foram de adaptação e treino aos procedimentos que mais tarde seriam necessários efetuar, sob a supervisão da Dra. Sandra Aguiar. Neste período inicial executei diversos procedimentos da área da microbiologia como preparação de meios de cultura, isolamento de culturas puras e medição de curvas de crescimento. Este período de adaptação foi crucial

para uma correta adaptação ao ambiente laboratorial, de forma a recordar as regras de utilização e segurança de um laboratório. Nos meses seguintes, foram executados os testes de suscetibilidade aos antibióticos (método de microdiluição) com recurso a métodos colorimétricos complementares e utilização de equipamentos de medição de densidade óptica.

Durante este período, quando me desloquei ao Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galénica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para o desenvolvimento dos lipossomas, tive mais contacto com a área da farmacologia. Preparei soluções antibióticas e lipídicas, manipulei diversos equipamentos laboratoriais, desenvolvi retas de calibração e, por fim, formulei os lipossomas utilizados no presente estudo.

Quando iniciei o estágio, todas as semanas a equipa do laboratório reunia e apresentava os desenvolvimentos e resultados dos seus projetos, de forma a desenvolver a discussão sobre os mesmos. Devido à atual pandemia, estas reuniões deixaram de ser possíveis, mas o contacto foi mantido por e-mail.

2. Introdução

2.1. Resistência aos Antibióticos: uma ameaça à saúde global

O surgimento dos antibióticos é um marco na história da medicina, que se inicia com a descoberta da penicilina. A partir desse momento e durante os 40 anos da “*golden era*”, para além da descoberta de novas classes de antibióticos, os que já existiam sofreram modificações com o objetivo de combater as resistências que iam surgindo (Acar and Moulin 2012).

Neste momento, estamos numa época em que a resistência aos antibióticos é um dos maiores desafios de saúde pública e da medicina moderna e que ocorre a nível global (WHO 2015a). Se não forem tomadas medidas a uma escala global, o mundo pode estar a avançar para uma era pós-antibiótico, onde as infeções bacterianas serão difíceis de tratar (Acar and Moulin 2012; WHO 2015b; DGS and DGAV 2019), estimando-se que ocorram cerca de 10 milhões mortes anuais, até ao ano de 2050, devido à problemática da resistência antimicrobiana (O’neill 2016).

De forma a impedir o surgimento de resistências aos antibióticos, é necessária uma intervenção mundial e multissetorial com medidas aplicadas à saúde pública, saúde animal e políticas ambientais. Esta harmonização é conseguida através do conceito “*One Health- Uma Só Saúde*”, originada pelo trabalho conjunto entre as organizações *World Health Organization* (WHO), *Food and Agriculture Organization* (FAO) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) que classificam a resistência aos antibióticos como uma prioridade (OIE 2015).

D’costa et al. (2011) observaram, através da deteção de genes de resistência presentes em espécies que se encontravam em sedimento congelado com 30 mil anos, que a resistência bacteriana a antibióticos é anterior à descoberta dos mesmos, concluindo que a resistência aos antibióticos antecede a pressão seletiva do seu uso na prática clínica. Embora a resistência possa ser um fenómeno natural, a sua ocorrência está a aumentar devido ao uso incorreto de antibióticos (escolha ou dosagem incorreta, automedicação, encurtar ou prolongar o tratamento e uso excessivo na agricultura), à inexistência de programas para prevenção e controlo de infeções, ao uso de medicamentos de qualidade inferior, à baixa capacidade laboratorial para identificar o microrganismo em tempo útil e o seu perfil de resistência, à inadequada vigilância e à regulamentação insuficiente (WHO 2015a). Em medicina veterinária, a resistência aos antibióticos é um problema mais complexo, devido à diversidade de espécies animais e dos seus habitats, às diferenças nas bactérias e mecanismos patogénicos envolvidos, ao número de classes de antibióticos disponíveis e a complexa epidemiologia envolvida (Acar et al. 2012).

Na União Europeia, 40% dos países afirma ter um plano de ação em curso de forma a combater a resistência aos antibióticos (WHO 2015a). Estes programas são considerados essenciais para o controlo de infeções, especialmente para impedir a transmissão de

microrganismos resistentes. Para além disso, a deteção, análise e rastreamento de microrganismos resistentes só será possível se houver laboratórios de investigação e se for implementado um mecanismo de vigilância nacional (WHO 2015a). Em Portugal, encontra-se implementado (2019-2023) o “Programa Nacional de Combate à Resistência aos Antibióticos (PNCRAM)” desenvolvido pela DGS e DGAV. O PNCRAM tem como objetivos a implementação do conceito “Uma Só Saúde”, melhorar o conhecimento sobre as resistências aos antibióticos, reduzir a incidência de infeção, otimizar o uso dos antimicrobianos e aumentar o investimento em novos medicamentos, métodos de diagnóstico, vacinas e outras intervenções relevantes (DGS and DGAV 2019).

As bactérias multirresistentes são, atualmente, uma grande preocupação a nível hospitalar, devido à elevada taxa de mortalidade que lhes está associada, assim como o aumento da frequência de infeções nosocomiais (WHO 2015b). Para além disso, a descoberta de novos antibióticos encontra-se em declínio, não acompanhando o aumento contínuo do número de bactérias resistentes, tornando esta situação mais alarmante. Tanto nos hospitais de medicina humana como nos veterinários, as bactérias *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia coli* e estafilococos resistentes à meticilina são os agentes que inspiram maior preocupação, juntamente com *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (Acar and Moulin 2012; OIE 2015). Com o aumento das infeções causadas por organismos multirresistentes, em medicina humana, surgiu o *Antimicrobial stewardship*, uma equipa multidisciplinar, que inclui médicos, microbiologistas clínicos, farmacêuticos, epidemiologistas e profissionais de controlo de infeções. O objetivo desta equipa de especialistas é assegurar a correta utilização dos antibióticos e minimizar o surgimento e propagação de resistências (Weese et al. 2013). Ao longo dos tempos, a presença destas equipas multidisciplinares em hospitais de medicina humana tem-se tornado mandatária, o que leva Edwards and Gould (2012) a afirmar a necessidade de implementação destas equipas em medicina veterinária. Embora o médico veterinário seja o responsável na linha da frente, além da existência de outros especialistas que fazem parte da equipa, é necessário ter em conta que a *compliance* do tutor também se inclui no sucesso da utilização dos antibióticos (Weese et al. 2013).

Ao longo do tempo, é indispensável, não só, avaliar os resultados das medidas implementadas relativamente ao uso de antimicrobianos, mas também, continuar a promoção da educação e garantir que as diretrizes aprovadas para o tratamento das várias doenças são dinâmicas e passíveis de sofrer atualizações, segundo as necessidades (Weese et al. 2013).

2.2. Infeção do Trato Urinário

As infeções do trato urinário (ITU) são uma causa comum de morbilidade entre os animais de companhia e uma das principais razões para o uso de antibióticos. Nestes casos, a escolha de um tratamento incorreto pode originar a resolução incorreta da infeção,

resistência aos antibióticos utilizados e necessidade de prolongamento ou repetição do tratamento. Estas preocupações estão relacionadas com a saúde animal e saúde pública, mas também, a nível económico e da regulamentação (Weese et al. 2019).

Em animais saudáveis não é esperada a presença de bactérias no trato urinário superior, bexiga, uretra proximal ou próstata. A presença de uma camada de glicosaminoglicano à superfície do epitélio de transição da bexiga, a microflora comensal dos ureteres, as propriedades antimicrobianas da urina, o esfíncter uretral funcional e micções frequentes são fatores intrínsecos do organismo que previnem a colonização destes locais. Quando estes mecanismos falham, as bactérias presentes na uretra, prepúcio e vagina invadem oportunisticamente o trato urinário (Sykes and Westropp 2013).

O diagnóstico de ITU bacteriana é mais frequente nos cães (Sykes and Westropp 2013), mas ultimamente foram reportadas, em alguns países europeus, frequências mais elevadas em gatos (Gerber et al. 2005; Eggertsdóttir et al. 2007), especialmente quando existem doenças concomitantes, como por exemplo diabetes *mellitus*, hiperadrenocorticism, hipotireoidismo e doença renal (McGuire et al. 2002; Sykes and Westropp 2013).

Num estudo europeu sobre a resistência aos antibióticos em ITU, Portugal reportou 299 casos, entre 2008 e 2013. A um nível global, *Escherichia coli* foi a bactéria mais frequentemente isolada como agente causador de ITU em animais de companhia, mas bactérias como *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.* e *Klebsiella spp.* também foram frequentemente isoladas (Marques et al. 2016).

Por forma a ajudar os clínicos a tomar as melhores decisões em relação a classificação, diagnóstico e tratamento, os membros de um grupo de trabalho do *International Society for Companion Animal Infectious Diseases* (ISCAID), classificaram as ITU em cistite bacteriana esporádica, cistite bacteriana recorrente, bacteriúria subclínica e pielonefrite (Weese et al. 2019).

2.2.1 Cistite Bacteriana Esporádica

Segundo as orientações anteriores (Weese et al. 2011), as classificações ‘complicada’ e ‘simples não complicada’ foram utilizadas para descrever a cistite bacteriana em cães e gatos. Em relação aos cães, é difícil compreender se ocorre infeção ‘não complicada’ ou se existem fatores de risco como causa primária. No caso dos gatos, as ITU são frequentemente definidas como ‘complicadas’ devido à sua frequência, presença de comorbidades e elevada incidência em gatos idosos (Sykes and Westropp 2013).

Atualmente, a cistite bacteriana esporádica é definida como uma infeção da bexiga, que ocorre esporadicamente e que se acompanha de sinais clínicos característicos do trato urinário inferior, como polaquiúria, disúria, estrangúria e hematúria. Esta nomenclatura aplica-se para descrever a infeção em fêmeas saudáveis e machos castrados, animais sem

alterações anatômicas e funcionais do trato urinário ou comorbidades relevantes, que tiverem menos de três episódios de cistite bacteriana nos últimos 12 meses. No caso dos machos inteiros, a cistite esporádica é rara, sendo que a prostatite bacteriana deve ser considerada na presença de sinais clínicos do trato urinário inferior (Weese et al. 2019).

O seu diagnóstico é feito com base na presença de sinais clínicos do trato urinário inferior, nos resultados da cultura bacteriana da urina e urianálise. No caso dos cães, enquanto se aguarda pelos resultados da cultura bacteriana, é aceitável iniciar o tratamento empírico com a associação amoxicilina e ácido clavulânico ou trimetoprim-sulfonamidas, embora este último esteja associado a efeitos secundários mais graves. A duração recomendada para o tratamento são 3 a 5 dias (Weese et al. 2019). No entanto, em humanos, já se comprovou que a resolução de infecções não complicadas é possível apenas através de analgesia, sendo tão eficaz como os antibióticos (Bleidorn et al. 2016). Aplicando aos animais de companhia, inicialmente podem ser prescritos analgésicos e adicionar os antibióticos 3 a 4 dias após, se os sinais clínicos persistirem ou se agravarem. No caso dos gatos, devido à baixa probabilidade de ocorrer cistite bacteriana na presença de sinais clínicos do trato urinário inferior, não é prudente iniciar qualquer antibioterapia antes da evidência bacteriológica, de forma a evitar o uso desnecessário de antibióticos. A nitrofurantoína, fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira geração devem ser reservados para as situações em que os fármacos utilizados empiricamente não sejam os apropriados do ponto de vista dos resultados da cultura bacteriana e respetivo antibiograma (Weese et al. 2019).

Se não ocorrerem melhoras clínicas nas 48 horas seguintes ao início do tratamento antimicrobiano, devem ser realizados outros exames complementares de diagnóstico. Por vezes, o antibiótico escolhido de forma empírica revela-se resistente. Na maioria dos casos, deve mudar-se o antibiótico, exceção feita para as situações com resposta clínica favorável. A mudança de antibiótico deve sempre ser feita com base na evidência e nunca de forma empírica (Weese et al. 2019).

No caso de cistite esporádica, não é recomendado a repetição da urianálise ou urocultura após o tratamento, se os sinais clínicos forem resolvidos com sucesso (Weese et al. 2019).

2.2.2 Cistite Bacteriana Recorrente

Esta definição teve origem na medicina humana (Arnold et al. 2016) e foi adotada na medicina veterinária segundo os mesmos critérios, ou seja, diagnóstico clínico de 3 ou mais episódios de cistite bacteriana durante os últimos 12 meses ou dois ou mais episódios nos últimos 6 meses (Weese et al. 2019). As cistites recorrentes podem ser o resultado de recidiva, infecção persistente/refratária ou reinfeção (Tabela 1) (Sykes and Westropp 2013).

Tabela 1: Definições aplicadas aos diferentes tipos de infecções do trato urinário recorrentes. Adaptado de Sykes and Westropp 2013.

ITU	Definição
Persistente/Refratária	Isolamento, mais de uma vez, do mesmo microrganismo, após o tratamento, apesar da suscetibilidade <i>in vitro</i> ao antibiótico utilizado.
Recidiva	Isolamento do mesmo microrganismo no decorrer de 6 meses, após o tratamento aparentemente eficaz entre culturas positivas.
Reinfecção	Isolamento de um microrganismo diferente, 6 meses após a resolução aparente de uma infecção anterior.

Legenda: ITU- Infecção do trato urinário

Em princípio, nos casos recorrentes, é provável que exista um fator de risco ou uma comorbidade que leva ao desenvolvimento da infecção urinária. Para além de repetir a cultura bacteriana da urina e urianálise, é necessário utilizar outros meios de diagnóstico, como por exemplo, ecografia, radiografia (com e sem contraste), cistoscopia e biópsias da mucosa vesical, com o intuito de encontrar a causa subjacente. Nestes casos, é importante que, antes de iniciar mais exames de diagnóstico, o clínico reveja a escolha e dose do antibiótico prescrito, a suscetibilidade da estirpe isolada ao antibiótico e a *compliance* dos donos (Weese et al. 2019).

Os principais objetivos do tratamento são a cura clínica com o mínimo de efeitos secundários associados. A cura microbiológica, ou seja, a eliminação da bactéria do organismo, é algo desejado, mas não obrigatório para a resolução clínica a curto e longo prazo (Weese et al. 2019).

O clínico pode optar por um início de tratamento apenas com analgésicos, enquanto aguarda o resultado de urocultura ou iniciar uma antibioterapia empírica, dependendo da gravidade dos sinais clínicos e das informações da anamnese. No caso de ser iniciado um antibiótico, a escolha deve ser reavaliada quando os resultados da urocultura estiverem disponíveis. A duração do tratamento pode ser idêntica à das cistites esporádicas, ou seja, entre 3 e 5 dias, aplicável aos casos de reinfecção. Tratamentos prolongados, entre 7 e 14 dias, devem ser aplicados nas infecções persistentes e nos casos em que existe elevada probabilidade de recidiva. Se as causas e/ou fatores subadjacentes forem identificados, deve preconizar-se, igualmente, um tratamento (Weese et al. 2019).

Em tratamentos de longa duração, pode considerar-se efetuar uma urocultura 5 a 7 dias após o início do tratamento. Se o resultado for positivo, é necessário avaliar a *compliance* dos donos e realizar mais exames de diagnóstico. Por outro lado, se o resultado for negativo, o clínico pode decidir se é benéfico terminar o tratamento antecipadamente. Pode, ainda,

considerar-se uma nova urocultura 5 a 7 dias após o fim do tratamento antimicrobiano (Weese et al. 2019).

Na medicina humana têm surgido alternativas para a prevenção e tratamento como, por exemplo, o uso de extrato e sumo de arando (Mcmurdo et al. 2009; Stapleton et al. 2012), probióticos (Stapleton et al. 2011) e produtos bioterapêuticos vivos que, num estudo de Segev et al. (2018), se mostraram promissores no tratamento de cistite recorrente, reportando cura completa em quatro dos nove cães do ensaio, em resposta à instilação de *E. coli* 2-12 obtida de pacientes com bacteriúria assintomática. No entanto, Weese et al. (2019) consideram que não existem evidências suficientes para a administração destas terapias alternativas nos animais de companhia.

2.2.3 Bacteriúria Subclínica

Esta situação ocorre quando a existência de bactérias na urina é comprovada por cultura bacteriana positiva e ausência de sinais clínicos característicos da presença de infeção do trato urinário (Weese et al. 2019). O termo 'bacteriúria' tem vindo a ser utilizado para descrever casos em que as bactérias são visíveis citologicamente, independentemente dos resultados da cultura (Way et al. 2013), no entanto, foi reportado, em cães, uma fraca concordância entre a deteção citológica de bactérias e uma cultura de urina positiva (Mcghie et al. 2014).

Pode ocorrer bacteriúria subclínica sem que existam fatores predisponentes. Mcghie et al. (2014) reportaram taxas de 2,1% desta condição em cães saudáveis. Esta taxa aumenta para 24% a 75%, por exemplo, nos grupos de cães com diabetes *mellitus*, obesos ou paralisados (McGuire et al. 2002; Wynn et al. 2016; Baigi et al. 2017). No caso dos gatos, o estudo da bacteriúria subclínica é limitado, mas pensa-se que a prevalência possa ser inferior ao reportado em cães (Weese et al. 2019).

Raros são os casos em que existe indicação para realizar cultura bacteriológica da urina de animais que não apresentam sinais clínicos. Exceção para os animais com comorbidades, particularmente aqueles com doenças como hiperadrenocorticismismo e diabetes *mellitus* (McGuire et al. 2002). É de salientar que, quando a bacteriúria é diagnosticada, devem ser investigadas as razões para a sua ocorrência (Weese et al. 2019).

Em medicina humana, segundo as *Infectious Diseases Society of America Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Asymptomatic Bacteriuria in Adults*, não é recomendado o tratamento antimicrobiano da maioria dos casos de bacteriúria assintomática (Nicolle et al. 2005). Desta forma, não existe evidência suficiente para que em medicina veterinária se escolha uma abordagem diferente (Weese et al. 2019).

Por vezes, nos animais, pode ser difícil compreender quando os sinais clínicos estão presentes. Nesses casos, um tratamento de curta duração (3-5 dias), à semelhança do

recomendado para a cistite esporádica, nomeadamente nas situações em que exista um elevado risco de desenvolvimento de uma infeção ascendente (pielonefrite) ou sistémica e se a bexiga for o foco de uma infeção extra-urinária. No caso de se tratar de uma bactéria multirresistente, o tratamento para controlo da infeção não é recomendado. Nestas situações, pensa-se que a mesma bactéria se encontre no trato gastrointestinal. Assim, se a bactéria fosse eliminada da bexiga, provavelmente o seu impacto seria limitado tendo em conta o risco geral a que o organismo está sujeito (Weese et al. 2019).

2.2.4 Infeção do Trato Urinário Superior - Pielonefrite

Uma pielonefrite é a infeção do parênquima renal, que pode ocorrer por ascensão de bactérias com origem numa infeção do trato urinário inferior ou de bacteriemia (Weese et al. 2019). Para além destas causas, a leptospirose deve ser considerada em zonas endémicas devido à nefrite que provoca nos animais infetados (Sykes et al. 2011).

O diagnóstico desta condição é desafiante. Se a pielonefrite for aguda, o diagnóstico pode ser feito com base no isolamento de bactérias aeróbias através de urocultura e pela evidência de sinais sistémicos de infeção, como febre, letargia e/ou poliúria e polidipsia. Por outro lado, estes animais podem apresentar-se oligúricos ou anúricos e sem sinais clínicos evidentes (Weese et al. 2019).

A cultura da urina recolhida por cistocentese e o teste de suscetibilidade a antibióticos deve ser prática comum. No caso de se tratar de um animal imunodeprimido ou febril, é recomendado que seja efetuado uma cultura de sangue (Weese et al. 2019). Ao nível analítico, o aumento das concentrações sanguíneas de creatinina e dimetilarginina simétrica (SDMA) podem ser um indicador de que existe lesão renal, no entanto, estes indicadores não são específicos para diagnosticar pielonefrite bacteriana como causa da lesão renal (Dahlem et al. 2017). Em cães que se encontrem em zonas endémicas de leptospirose e cuja cultura bacteriológica resultou negativa, o seu diagnóstico pode ser serológico ou através de PCR (Sykes et al. 2011).

O tratamento deve ser iniciado imediatamente, enquanto se aguardam os resultados, com antibióticos que tenham eficácia local para *Enterobacteriaceae*, como por exemplo, fluoroquinolonas ou cefalosporinas de terceira geração (cefpodoxima por via oral e ceftazidima ou cefotaxima por via endovenosa) (Weese et al. 2019).

Quando são conhecidos os resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos, o clínico deve tomar decisões relativamente aos antibióticos prescritos empiricamente. Se foi iniciada uma terapia combinada e a estirpe isolada é suscetível a ambos os medicamentos, um deles pode ser descontinuado. No caso de a estirpe isolada ser resistente a um dos medicamentos utilizados inicialmente, esse antimicrobiano deve ser interrompido e substituído por um suscetível, se o clínico entender que não existe evidência de melhora

clínica. No entanto, se houver melhorias, a escolha inicial poderá ser mantida (Weese et al. 2019).

Em 2011, Weese et al. recomendavam um tratamento de 4 a 6 semanas. Em medicina humana, a duração do tratamento para pielonefrite bacteriana é de 7 a 14 dias (Morello et al. 2016), o que leva Weese et al. (2019) a considerar que não existem razões para que o tratamento seja mais prolongado do que nos humanos, recomendando que o tratamento dure entre 10 a 14 dias. Uma nova urocultura, urianálise e bioquímica sanguínea (concentração de creatinina) deve ser realizada 1 a 2 semanas após o fim do tratamento.

Na ausência de melhoria dos sinais sistêmicos, hematologia e bioquímica sanguínea nas primeiras 72 horas de terapia antimicrobiana é de considerar outros diagnósticos para além da pielonefrite bacteriana (Weese et al. 2019).

2.3 Bactérias Alvo do Presente Estudo

Devido à sua particular aptidão de adesão às células epiteliais, a *E. coli* é a bactéria mais frequentemente associada às infeções do trato geniturinário. Outros agentes bacterianos também isolados são estafilococcus coagulase-positivos e coagulase-negativos, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* (Sykes and Westropp 2013). Tendo em conta a frequência dos agentes bacterianos supracitados, seguidamente, o presente estudo incidirá, especialmente, nas características, patogenicidade, diagnóstico e resistência aos antibióticos das bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, que serão alvo do estudo prático.

2.3.1 *Escherichia coli*

- **Considerações gerais**

As bactérias do género *Escherichia coli* são Gram-negativas e pertencem à família *Enterobacteriaceae*. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) e podem ser imóveis ou movidas por flagelos. As suas estirpes diferenciam-se com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K). Para além disso, a presença de fímbrias (F), que agem como adesinas, facilitam a adesão à mucosa e a produção da endotoxina lipopolissacáride (LPS) também têm um papel importante no desenvolvimento de doença (Quinn et al. 2011a).

O trato intestinal dos mamíferos é colonizado, logo após o nascimento, por *Escherichia coli* de origem ambiental. A partir desse momento, a *E. coli* torna-se numa bactéria comensal da microbiota, que pode ser encontrada em várias porções do intestino (Quinn et al. 2011a; Markey et al. 2013). A sua excreção ocorre através das fezes e sobrevive em partículas fecais, poeiras e água durante semanas ou meses (Markey et al. 2013).

- **Patogenicidade**

A maioria das estirpes de *E. coli* tem baixa virulência, mas podem causar infecções oportunistas em locais extraintestinais, como a glândula mamária, o trato urinário e o útero, e provocar, respetivamente, mastite, cistite e piómetra (Quinn et al. 2011a). As estirpes patogénicas possuem fatores de virulência que permitem a colonização de superfícies mucosas e o desenvolvimento de doença. A classificação destas espécies de *E. coli* está relacionada com a doença que provocam e com os fatores de virulência que possuem (Markey et al. 2013). Em termos de saúde pública e perigo para os humanos, a *E. coli* O157:H7 é um dos principais agentes zoonóticos de origem alimentar, responsável por doenças como a síndrome da colite hemorrágica (Quinn et al. 2011a).

- **Diagnóstico laboratorial de infeções oportunistas**

O isolamento desta bactéria é possível através de um crescimento quase puro a partir de amostras colhidas de forma asséptica, como zaragatoas cervicais ou urina (Markey et al. 2013).

As estirpes de *E. coli*, na sua maioria, são semeadas em meio de cultura agar-sangue ou MacConkey e incubadas em meio aeróbio durante 24 a 48 horas à temperatura de 37 °C. Em meio de cultura agar-sangue, as colónias de *E. coli* apresentam cor cinzenta, brilho, forma arredondada e um cheiro característico. Por outro lado, quando semeadas em meio de cultura agar MacConkey, tornam-se rosa-brilhante devido à produção de ácido resultante da fermentação da lactose. O meio agar de eosina azul de metileno (EMB) é uma alternativa menos utilizada pelos laboratórios, no qual as colónias de *E. coli* apresentam um brilho metálico característico, permitindo distingui-las de outras bactérias como *Salmonella sp.* e *Klebsiella pneumoniae* (Quinn et al. 2011a; Markey et al. 2013). As galerias API, neste caso API20E, podem ser uma alternativa mais fácil e rápida para uma identificação completa. Baseiam-se na ocorrência de reações bioquímicas que são interpretadas de acordo com tabelas ou quadros de leitura pré-estabelecidos. A sua identificação é possível através de um sistema informático, onde se obtém um perfil numérico (7 algarismos), que denomina o índice analítico de perfil (Markey et al. 2013; BioMerieux SA 2018). Outra alternativa rápida para a identificação de *E. coli*, pode ser feita através de provas bioquímicas, como o teste 'IMViC' (indol + / MR + / VP- / citrato), tendo em conta que a sua combinação de resultados é quase exclusiva desta bactéria, permitindo distingui-la de outros coliformes (Quinn et al. 2011a).

- **Resistência aos antibióticos**

Os dados recolhidos por Baum and Marre (2005) sugerem que as estirpes de *E. coli* desenvolvem, com elevada frequência, resistência às penicilinas de largo espectro e trimetoprim, ao contrário do que acontece em relação às cefalosporinas de terceira geração e nitrofurantoína, em que o aparecimento de resistências é um acontecimento raro. Contudo, mais recentemente, existe uma preocupação relacionada com o surgimento de resistência às

fluoroquinolonas e à produção de β -lactamases de espectro alargado (ESBL) pelas estirpes de *E. coli* multirresistente. Estas ESBL inativam a maioria das β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas da terceira geração (Markey et al. 2013).

2.3.2 *Klebsiella Pneumoniae*

- **Considerações gerais**

As bactérias do género *Klebsiella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são definidas como Gram-negativas, geralmente encapsuladas, tomando a forma de um bastonete, não-móveis e causadoras de infeções oportunistas, sendo que as diferentes espécies de *Klebsiella* podem ser identificadas de acordo com as suas reações bioquímicas.

Têm uma presença ubiqüitária na natureza, estando presentes no solo, nas águas de esgoto e em plantas, para além das superfícies mucosas do intestino dos mamíferos (Podschun and Ullmann 1998; Markey et al. 2013).

- **Patogenicidade**

Em medicina humana, as bactérias do género *Klebsiella* são responsáveis por algumas infeções nosocomiais, geralmente envolvendo as vias urinárias e respiratórias (Podschun and Ullmann 1998). Em medicina veterinária, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* está frequentemente associada a mastites em vacas leiteiras, doenças reprodutivas em éguas e doenças do trato urinário em canídeos, especialmente nas fêmeas (Markey et al. 2013).

Existem, pelo menos, 77 tipos diferentes de antígenos capsulares (K) identificados. A sua presença é um dos fatores de virulência que permite as bactérias do género *Klebsiella* provocarem doença, pois impedem a fagocitose efetuada pelos granulócitos polimorfonucleares e melhoram a sobrevivência intracelular (Podschun and Ullman 1992; Quinn et al. 2011a; Markey et al. 2013). O pili é o fator de virulência que permite a proximidade e aderência às superfícies mucosas das células hospedeiras. Especificamente, o pili do tipo 1 tem um papel importante na patogénese das doenças do trato urinário (Fader and Davis 1980). A presença dos sideróforos, quelantes do ferro produzido por algumas bactérias, é essencial para a sua sobrevivência, tendo em conta que o suprimento de ferro livre disponível no ambiente hospedeiro é diminuído. Estes componentes são capazes de absorver competitivamente o ferro que se encontra ligado às proteínas do hospedeiro (Wooldridge and Williams 1993; Quinn et al. 2011a).

- **Diagnóstico laboratorial**

A *K. pneumoniae*, à semelhança de outras *Enterobacteriaceae*, é fermentadora de lactose, logo quando isolada no meio agar-MacConkey, apresenta colónias de grandes dimensões, com consistência mucosa e, ao contrário das colónias de *E. coli*, a sua cor tende a ser rosa mais pálido. Quando as espécies de *Klebsiella* são isoladas em agar-sangue, as

colônias apresentam-se cinzentas, de aspeto mucoide e existe coalescência entre as mesmas. O teste 'IMVIC' (-/-(+)/+/+) também pode ser efetuado, mas o seu resultado não se revela tão esclarecedor como no caso da *E. coli*. Para uma identificação completa pode recorrer-se às galerias API, neste caso API20E (Markey et al. 2013).

- **Resistência aos antibióticos**

A gentamicina e as cefalosporinas são os antibióticos de eleição para o tratamento de infeções causadas por *K. pneumoniae* e, quando estes não se mostram eficazes, a associação trimetoprim-sulfametoxazol é a alternativa para o tratamento (Markey et al. 2013). O surgimento de estirpes multirresistentes está diretamente relacionado com a produção de ESBL pelas estirpes de *Klebsiella spp.*, à semelhança do que ocorre com a *E. coli*, o que as torna resistentes às cefalosporinas de largo espectro. Estas ESBL são codificadas por plasmídeos e um dos exemplos é a resistência à ceftazidima observada nos isolados de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (Hibbert-Rogers et al. 1995; Markey et al. 2013).

2.4 Terapêutica Antimicrobiana

O tratamento das ITU é, na maioria das vezes, uma combinação entre a remoção das causas subjacentes à doença e uma antibioterapia apropriada ao tipo de infeção em causa (Sykes and Westropp 2013). De forma a aplicar uma antibioterapia adequada, é necessário conhecer os mecanismos de ação dos diversos antibióticos.

A classificação dos antibióticos mais utilizada baseia-se no mecanismo de ação, sendo que os seus alvos de ação podem ser ao nível da parede, membrana celular ou no interior da célula, afetando várias estruturas (Kapoor et al. 2017). Entre os vários mecanismos de ação, destacam-se a inibição da biossíntese de proteínas, no caso dos aminoglicosídeos, tetraciclina e macrólidos, que têm como alvo as subunidades 30S e 50S do ribossoma bacteriano; a inibição da síntese e modificação ao nível dos ácidos nucleicos, como por exemplo as sulfamidas; a inibição da replicação de DNA, como no caso das quinolonas e fluoroquinolonas; e os antibióticos que têm como alvo da sua ação a parede ou membrana celular, onde se incluem os β -lactâmicos, glicopeptídeos e a fosfomicina (Bush 2012; Cambau and Guillard 2012; Kapoor et al. 2017).

Os antibióticos que têm a parede ou membrana celular das bactérias como local de ação são considerados bactericidas. Devido à sua ação disruptiva, a viabilidade da bactéria é impossibilitada, o que os torna a escolha mais frequente para o tratamento de várias infeções, tanto na medicina humana como na veterinária (Bambeke et al. 2008; Bush 2012).

- **β -Lactâmicos**

Os antibióticos β -lactâmicos foram, inicialmente, desenvolvidos para tratar infeções causadas por cocci Gram-positivos. Após a introdução dos antibióticos β -lactâmicos de largo

espectro, o tratamento das infecções causadas por bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-negativas pode, também, ser feito recorrendo a estes fármacos (Livermore 2002).

Todos os antibióticos que pertencem à classe dos β -lactâmicos utilizam um mecanismo de ação similar. Os seus alvos enzimáticos são as múltiplas proteínas específicas de ligação à penicilina (PBP do inglês *penicillin-binding proteins*), que fazem parte da etapa final da síntese da parede celular bacteriana. As PBP bacterianas possuem um aminoácido, a serina, no local de ação enzimática, que pode sofrer acetilação pelos β -lactâmicos durante o desenvolvimento bacteriano (Georgopapadakou and Liu 1980). Uma acetilação rápida da serina seguida por uma desacetilação lenta, resulta numa inativação virtual das PBP, levando à morte da bactéria (Bush 2012).

Em termos de resistência, o mecanismo mais comum associado às bactérias Gram-positivas passa pela aquisição de novas PBP que apresentam uma baixa afinidade para os β -lactâmicos, um exemplo deste mecanismo são os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (Ryffel et al. 1992). As bactérias Gram-negativas desenvolveram um mecanismo de resistência que não envolve a modificação das PBP, mas a produção de β -lactamases. Estas enzimas hidrolisam o anel β -lactâmico da estrutura do antibiótico, causando a perda da capacidade de inibição da síntese da parede celular (Williams 1999). O desenvolvimento de fármacos inibidores das β -lactamases, como por exemplo o ácido clavulânico, tem sido a principal tática por parte da indústria farmacêutica, de forma a minimizar a atividade destas enzimas (Drawz and Bonomo 2010). Existem mais de 1000 β -lactamases com características variáveis a nível molecular e funcional, podendo ser agrupadas por famílias. As famílias que causam maior preocupação aos clínicos e microbiologistas são as β -lactamases de espectro alargado (ESBL), capazes de hidrolisar penicilinas e algumas cefalosporinas, as carbapenemases, com capacidade para hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo os monobactâmicos, e as metalo- β -lactamases (MBL) que hidrolisam todos os β -lactâmicos, excluindo os monobactamâmicos (Bush 2010).

2.4.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas foram descobertas em 1948 e, como a maioria dos antibióticos, são de origem natural, derivadas do fungo *Cephaosporium acremonium* (Choma 2007). As vantagens do seu uso na clínica prendem-se com a estabilidade em relação às β -lactamases, boa atividade contra PBP e possibilidade de penetração através da parede celular bacteriana. A classificação pode ser efetuada de diversas formas, desde o espectro de atividade antimicrobiana, estrutura química, resistência às β -lactamases e farmacologia clínica, mas a que mais se destaca é a classificação baseada na geração, ou seja, tendo em conta a descoberta cronológica, sendo que existem quatro diferentes (Weese et al. 2013). A primeira geração é predominantemente ativa contra bactérias Gram-positivas e as gerações seguintes

apresentam um aumento sucessivo da atividade contra as bactérias Gram-negativas (Shahbaz 2017). A classificação das cefalosporinas em gerações, a caracterização do seu espectro de ação e os respectivos exemplos encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2: Classificação das cefalosporinas por gerações (descoberta cronológica): espectro de ação e exemplos (Prescott 2013; Devansh and Kumar 2015).

Grupo	Espectro de ação	Exemplos
1ª geração	Ação mais específica para bactérias Gram-positivas, com a principal atividade nos cocos, como por exemplo, Streptococci, Staphylococci, Enterococci.	Cefradina, cefazolina, cefadroxila, cefalexina
2ª geração	Espectro de ação ligeiramente mais aumentado, incluindo bactérias Gram-negativas e excluindo os anaeróbios. Maior resistência à atividade das β -lactamases devido a uma alteração estrutural.	Cefaclor, cefotetana, cefoxitina, cefuroxima, cefprozila
3ª geração	Eficazes contra a maioria das bactérias Gram-negativas, devido à sua maior estabilidade em relação às β -lactamases.	Cefotaxima, ceftiofur, ceftriaxona, cefpodoxima
4ª geração	Atividade contra um espectro ainda mais alargado de bactérias Gram-negativas e positivas. Capacidade superior para resistir à ação das β -lactamases.	Cefepima

Embora a classificação em gerações seja a mais utilizada, existe alguma inadequação por ter como base a descoberta cronológica das várias cefalosporinas. Assim, foi desenvolvida uma classificação expandida, onde as cefalosporinas são agrupadas em sete grupos que têm por base a atividade antimicrobiana, a estabilidade em relação às β -lactamases e propriedades farmacológicas, não abandonando completamente a divisão por gerações (Weese et al. 2013).

Em termos de absorção, existem poucas cefalosporinas estáveis em ambiente ácido, assim nem todas podem ser administradas por via oral (Christian J and Christian S 1997). O tempo de semi-vida da maioria destes fármacos é curto, cerca de 1 a 2 horas (Weese et al. 2013), contudo os níveis séricos máximos são elevados em relação à concentração mínima inibitória (CMI) e, por isso, com alguma frequência, as cefalosporinas são administradas em intervalos que equivalem a vários tempos de semi-vida, ou seja, a cada 6, 8, 12 ou 24 horas. Para além disso, os antibióticos que inibem a síntese da parede celular necessitam de atividade por parte das bactérias alvo, portanto a escolha deve recair sobre intervalos entre dosagens mais longos, permitindo que nesse tempo as bactérias recomecem a sua atividade de crescimento (Christian J and Christian S 1997). O grau de ligação às proteínas plasmáticas é variável, mas no caso dos antibióticos em que essa ligação é superior a 85%, o seu tempo

de semi-vida no sangue é prolongado, devido à impossibilidade de passagem através dos tecidos, exemplos disto ocorrem quando é administrada cefazolina, ceftriaxona e cefoperazona (Christian J and Christian S 1997).

A sua distribuição ocorre na maioria dos fluídos corporais e tecidos, incluindo rins, pulmões e osso, mas têm baixa penetração no líquido cefalorraquidiano (LCR), embora algumas cefalosporinas de terceira e quarta geração, como por exemplo a ceftriaxona, tenham uma maior capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Weese et al. 2013). A sua excreção ocorre, para a maioria das cefalosporinas, através do rim por secreção tubular e filtração glomerular, sendo que o primeiro mecanismo predomina. Existem exceções a este mecanismo de excreção, por exemplo a cefapirina e cefotaxima sofrem desacetilação no fígado e a ceftriaxona e cefoperazona são eliminadas através da combinação de excreção renal e biliar (Christian J and Christian S 1997).

2.5 Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

O laboratório de microbiologia veterinária desempenha um papel fundamental na prática da medicina baseada na evidência, fornecendo informações sobre cultura de microrganismos e suscetibilidade aos antimicrobianos, que serão utilizadas pelos clínicos no diagnóstico e tratamento. Embora, na sua maioria, os laboratórios veterinários utilizem as mesmas técnicas que os laboratórios de diagnóstico humano, existem algumas diferenças que incluem a dificuldade de cultivo de organismos específicos da área da veterinária, a seleção de painéis antimicrobianos personalizados para os testes de suscetibilidade e considerações sobre a segurança alimentar (Weese et al. 2013).

Inicialmente, cada laboratório desenvolvia os seus próprios métodos de identificação da suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos, no entanto, era necessário o desenvolvimento de métodos padrões universais, para que os resultados fossem válidos quando comparados entre laboratórios (Weese et al. 2013). Assim, formou-se o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) por forma a harmonizar os métodos utilizados e os critérios de interpretação em todos os laboratórios (CLSI 2020). A partir de 1987, formou-se o *European Committee On Antimicrobial Suscetibility Testing* (EUCAST), com o objetivo de aplicar as mesmas normas dos TSA a todos os laboratórios europeus (EUCAST 2003; EUCAST 2019).

Os testes de suscetibilidade a antibióticos podem produzir resultados categóricos, caracterizando os antibióticos em suscetível, intermédio ou resistente, ou quantitativos através da concentração mínima inibitória (CMI). Em relação aos métodos, podem ser efetuados por difusão ou diluição (Weese et al. 2013).

Do ponto de vista laboratorial existe consenso sobre a apresentação dos resultados, mas os clínicos necessitam de definições que possam ser utilizadas de forma universal, para

descrever e classificar as bactérias que são resistentes a vários antimicrobianos. Por essa razão, Magiorakos et al. (2012) propuseram definições para vários graus de multirresistência para *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* devido à sua importância epidemiológica. No entanto, estas definições podem ser aplicadas a outras bactérias, num futuro próximo.

A classificação MDR (multi-drug resistant) é a mais frequentemente utilizada, tanto para as bactérias Gram-positivas como para as Gram-negativas, quando existe resistência a três ou mais classes de antibióticos. Outro método aplicado é quando a bactéria é resistente a um antibiótico importante, como por exemplo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Nestes casos, é sugerido que se crie um acrónimo baseado na resistência (Falagas et al. 2006; Siegel et al. 2006; Cohen et al. 2008; Magiorakos et al. 2012).

Outra definição possível é XDR (extensively drug resistant), uma classificação significativa do ponto de vista epidemiológico, devido à resistência a múltiplos antimicrobianos e à probabilidade de resistência a todos os antibióticos aprovados (Falagas et al. 2006; Siegel et al. 2006; Cohen et al. 2008; Magiorakos et al. 2012). Esta classificação foi criada pela necessidade de descrever a resistência aos agentes de primeira linha, no caso da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (CDC 2006). Dois critérios mais comumente utilizados para caracterizar as bactérias como XDR são o número de antibióticos, classes ou subclasses a que a bactéria é resistente e a resistência a um ou mais agentes antimicrobianos importantes (Paterson and Doi 2007; Falagas and Karageorgopoulos 2008). PDR (pandrug resistance) é outra classificação proposta, que pode ter várias interpretações, desde resistentes a todos os antibióticos aprovados, testados rotineiramente ou disponíveis no mercado. Esta definição é subjetiva e inconsistente, o que pode levar a interpretações erradas aquando da sua utilização (Falagas and Karageorgopoulos 2008; Magiorakos et al. 2012).

2.5.1 Método de Difusão

Os testes baseados no método de difusão podem ser efetuados através de discos impregnados com antibióticos, produzindo resultados categóricos, ou através de um gradiente de concentração, dando origem a resultados quantitativos. Em ambos os casos, o crescimento bacteriano é inibido pela difusão de um antibiótico através de um meio sólido. Os tamanhos da zona de inibição formada variam em função da taxa de difusão do medicamento, da espessura do meio e concentração do medicamento no disco, tornando necessário a padronização do método para que seja possível a sua interpretação. Estes testes são fáceis de executar, versáteis e é possível adaptá-los às espécies bacterianas pretendidas (Weese et al. 2013).

Os testes de difusão em disco são realizados em placas com meio agar Mueller-Hinton de 4mm de espessura, onde é semeado o inóculo que corresponde a 0,5 na escala de

McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/ml), utilizando discos impregnados com os antibióticos que se pretende testar. Posteriormente, ocorre a incubação a 37 °C durante 24 horas e no fim desse período a zona de inibição formada é comparada com os valores de referência (EUCAST 2020).

Os testes de gradiente, por exemplo *E-test*, são efetuados de forma semelhante aos testes de disco. As tiras contêm um antimicrobiano num gradiente de concentrações da mais baixa para a mais alta, correspondente aos valores de concentração de antibiótico que se encontram descritos na tira (bioMerieux SA 2012; Weese et al. 2013).

2.5.2 Método de Diluição

Neste método é utilizado, na maioria das vezes, um meio líquido ou agar Mueller-Hinton. No meio de cultura são testadas diluições duplicadas de antibiótico (por exemplo: 0,12 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml), sendo possível definir as CMI, ou seja, a concentração mais baixa em que não ocorre crescimento bacteriano. Nas placas de agar Mueller-Hinton, o antibiótico encontra-se incorporado. Em meio líquido, para além do antibiótico a testar, é adicionado o inóculo de bactérias com uma concentração final de 5×10^5 UFC/ml (EUCAST 2019).

2.6 Resistências aos Antibióticos

Durante as últimas décadas, o uso generalizado dos agentes antimicrobianos, tanto na saúde humana como animal, tem levado o mundo a confrontar-se com o surgimento descontrolado de resistências antimicrobianas (OIE 2015). Os mecanismos de resistência aos antibióticos têm sido extensivamente estudados, tanto do ponto de vista genético como bioquímico, e a sua influência nas várias estruturas celulares. Estes mecanismos podem ser intrínsecos à própria bactéria ou adquiridos (figura 1) (Alekhshun and Levy 2007; Davies D and Davies J 2010).

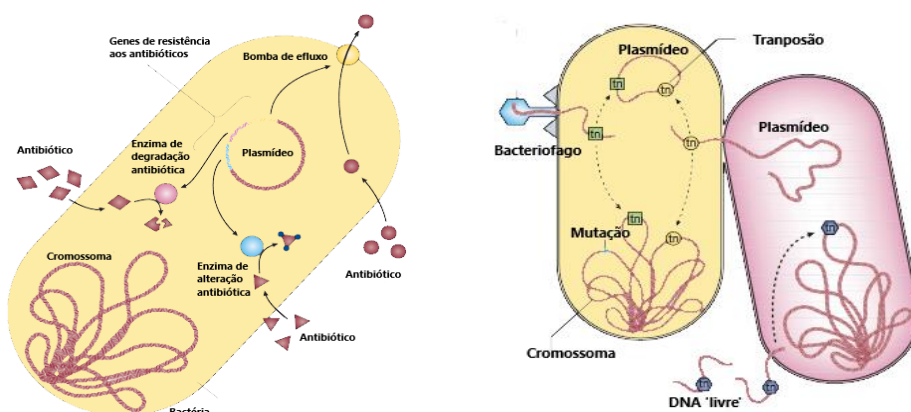


Figura 1: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de resistência intrínseca (esq) e adquirida (drt). Adaptado de Levy and Bonnie 2004.

2.6.1 Resistência Intrínseca

É a capacidade natural que uma espécie bacteriana tem de resistir à ação de um antimicrobiano, devido às suas características estruturais e funcionais. Estes mecanismos inatos estão codificados num conjunto de genes de resistência, denominado resistoma intrínseco, que são transmitidos à descendência durante a divisão celular (Davies D and Davies J 2010).

- **Bombas de efluxo**

Impedem que o antibiótico chegue ao local de ação. As proteínas existentes na membrana citoplasmática das bactérias permitem a excreção de substâncias nocivas, neste caso os antibióticos, mantendo a sua concentração intracelular baixa. Todos os antibióticos, com exceção da polimixina, são suscetíveis à ativação destes sistemas de efluxo (Kapoor et al. 2017).

- **Redução da permeabilidade**

Este mecanismo de resistência está relacionado com a limitada permeabilidade de algumas bactérias em relação aos antibióticos. Um exemplo concreto, é a resistência intrínseca dos organismos Gram-negativos aos macrólidos, devido à baixa permeabilidade da sua membrana a estes antibióticos (Poole 2002).

- **Inativação enzimática**

O antibiótico sofre alteração, tanto no interior da célula como no seu exterior. As β -lactamases são enzimas com função de hidrolisar quase todos os antibióticos β -lactâmicos que tenham uma ligação entre um éster e um grupo amina, como por exemplo as penicilinas e cefalosporinas, sendo a *Klebsiella pneumoniae* exemplo de uma estirpe capaz de produzir estas enzimas. Embora as β -lactamases sejam as enzimas mais estudadas, existem outras, como as que têm capacidade de modificar os aminoglicosídeos reduzindo a afinidade e impedindo a sua ligação à subunidade ribossomal 30S, sendo identificadas nas bactérias *S. aureus*, *E. faecalis* e *S. pneumoniae* (Kapoor et al. 2017).

- **Ausência, alteração e duplicação do alvo**

Ocorre uma redução ou ausência de afinidade entre o antibiótico e a bactéria alvo (Arzanlou et al. 2017). A ausência de alvo ocorre nos casos em que a bactéria não possui o componente celular para o qual o antibiótico tem atividade, como por exemplo, o *Mycoplasma* sp ser resistente às penicilinas por ausência de parede celular (Bébéar et al. 2011). Quanto à alteração de alvo, pode ocorrer devido a mutações espontâneas nos genes bacterianos. Tendo em conta que a interação entre o fármaco e a bactéria é bastante específica, uma ligeira alteração pode ter consequências na ligação com o antibiótico (Kapoor et al. 2017). Nos casos em que ocorre duplicação do alvo, existe um desvio do alvo sensível pelo uso de uma forma resistente (Acar and Moulin 2012).

- **Biofilmes**

Para além dos genes presentes no resistoma, também se pode verificar uma resistência fenotípica relacionada com as alterações do ambiente bacteriano. Quando ocorre uma infeção, as bactérias agrupam-se, formando os biofilmes, com o objetivo de defesa, formação de uma comunidade e colonização. Esta é a forma mais comum de organização bacteriana na natureza (Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet 2019). As bactérias que estão associadas à formação de biofilmes são *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* e *P. aeruginosa* (Jefferson 2004).

Os biofilmes têm a capacidade de se desenvolver em diversos locais, tanto em tecidos vivos como em superfícies inertes. A sua formação ocorre quando os microrganismos se organizam em comunidade protegidos por uma matriz exterior composta por polissacáridos, DNA e proteínas (Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet 2019). Com o tempo, os biofilmes têm a capacidade de evoluir enriquecendo-se com outras espécies bacterianas que cooperam com as existentes, de forma a neutralizar a ação antimicrobiana. Quando as bactérias se encontram organizadas são cerca de mil vezes mais resistentes aos antibióticos do que quando se encontram na forma de culturas planctónicas (Chin et al. 2017).

No interior do biofilme, a presença de uma elevada densidade bacteriana é propícia a que ocorra transferência de genes, seleção de bactérias resistentes e aumento da frequência de mutações (Rodríguez-Rojas et al. 2012). Uma subpopulação, de entre as bactérias presentes no biofilme, pode sofrer alterações fisiológicas e metabólicas com o objetivo de diminuir ao máximo a atividade metabólica, levando a que mais células se tornem resistentes, denominadas células persistentes (Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet 2019). Para além dessa capacidade, os biofilmes são dotados de *swarming*, ou seja, conseguem movimentar-se de forma coordenada através de flagelos ao longo de superfícies sólidas ou semi-sólidas (Kearns 2010).

Durante a hospitalização dos animais com ITU, é comum a utilização de cateteres urinários, local onde, frequentemente, se formam os biofilmes, levando ao desenvolvimento de ITU persistente e refratária à terapia antimicrobiana instituída (Trautner and Darouiche 2004). Oliveira et al. (2014), reportaram uma associação significativa entre a produção de biofilmes e a resistência às fluroquinolonas em estirpes de *E. coli* pertencentes a animais com diagnóstico de ITU.

2.6.2 Resistência Adquirida

Quando um antibiótico é utilizado, o seu sucesso terapêutico pode ser comprometido pelo potencial desenvolvimento de tolerância ou resistência, a partir do momento em que é usado repetidamente. Nestas condições é exercida uma pressão seletiva em que as bactérias

mais suscetíveis são eliminadas em detrimento das mais resistentes, que têm a capacidade de proliferar (Davies D and Davies J 2010).

- **Mutações**

As mutações ocorrem nos genes cromossômicos bacterianos, o que resulta num aumento da expressão dos mecanismos de resistência intrínseca e nas alterações de permeabilidade, por perda de porinas e modificação do alvo (Ruppé et al. 2015).

- **Transferência horizontal de genes**

É o mecanismo de resistência adquirida mais frequente. Ocorre a transferência horizontal de genes (THG) entre uma bactéria resistente e uma bactéria suscetível, em ambientes onde existe uma mistura destas populações, sendo que a microbiota intestinal é o local privilegiado para a ocorrência deste tipo de resistência. A THG pode acontecer como efeito secundário do tratamento com recurso a antibióticos. Este processo pode ocorrer através de transdução, transformação ou conjugação (Acar and Moulin 2012). A transformação é um mecanismo ativo em que material genético extracelular (DNA livre), que se encontra no ambiente que rodeia a bactéria, é capturado e degradado parcialmente com o intuito de ser incorporado no seu genoma (Grohmann et al. 2019). A Transdução é mediada por um bacteriófago que transporta partes do material genético originário da cápside do fago para a bactéria, embora existam raros casos em que os fagos são portadores de genes de antibioresistência. Por último, na conjugação é o mecanismo de THG mais comum para a disseminação dos genes de resistência aos antibióticos (Davies D and Davies J 2010). O processo requer, para além de um contacto próximo entre as bactérias, a formação de poros, por onde será possível a passagem das moléculas de DNA que irão integrar o genoma da bactéria recetora (Grohmann et al. 2019).

2.7 Novas Abordagens Terapêuticas - Lipossomas

Nos dias de hoje, face ao aumento das resistências aos antibióticos, procuram-se soluções inovadoras para mitigar esse problema e acelerar o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos. As novas abordagens têm como objetivo atuar e ultrapassar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias, assim como evitar o desenvolvimento de novas estirpes resistentes (O'Neill 2016). Estas soluções inovadoras podem ter uma ação não específica ao nível da membrana celular, alvos e mecanismos de ação múltiplos, substituir as estirpes resistentes, ação específica e estimulação do sistema imunitário (Klaenhammer 1988; Yeaman and Yount 2003; Quinn et al. 2011a). Na tabela 3 encontra-se algumas destas alternativas à utilização dos antibióticos e os respetivos exemplos da sua utilização.

Tabela 3: Alternativas terapêuticas à utilização dos antibióticos: definição e exemplos práticos de utilização.

Nome	Definição
Péptidos antimicrobianos	Péptidos produzidos pela maioria dos organismos vivos (bactérias, plantas, animais) como mecanismo de defesa imunitário contra microrganismos (Yeaman and Yount 2003). Exemplo: péptido HBD-1 mostrou eficácia, <i>in vitro</i> , contra estirpes laboratoriais e clínicas de <i>E. coli</i> (Valore et al. 1998).
Bacteriocinas	Pequenos péptidos de origem bacteriana com atividade antimicrobiana contra diferentes grupos de microrganismos (Klaenhammer 1988). Exemplo: utilização de bacteriocinas para o controlo de <i>Campylobacter spp</i> na produção de frangos (Svetoch and Stern 2010).
Auto-vacinas	Medicamento veterinário imunológico e inativado. Preparado especificamente a partir de agentes patogénicos e de antígenos provenientes do animal/grupo de animais que se pretende tratar (Regulamento nº314 2009). Exemplo: utilização de auto-vacinas no tratamento de mastites causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> em vacas leiteiras (Madhava et al. 2020).
Bacteriófagos	Vírus que infetam e destroem bactérias. Têm elevada especificidade, sendo que cada fago é específico apenas para uma espécie ou estirpe bacteriana (Quinn et al. 2011b). Exemplo: uso de terapia bacteriofágica em ITU refratária causada por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Khawaldeh et al. 2011).
Nanopartículas	Funcionam como veículos de entrega de fármacos, permitindo aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade (Brooks and Brooks 2014). Exemplo: incorporação de polimixina B em lipossomas no tratamento de infeções bacterianas causadas por bactérias Gram-negativas (Alipour et al. 2008).

Os lipossomas (figura 2) são compostos por camadas lipídicas concêntricas, apenas separadas por compartimentos aquosos. Esta formação ocorre quando os fosfolípidios, contendo 2 cadeias de hidrocarbonetos e um grupo polar hidrofílico, são expostos a um ambiente aquoso. Bangham and Horne (1964) foram os primeiros a observar e descrever a

formação espontânea de vesículas lipídicas. Posteriormente, Sessa and Weissmann (1968) foram os primeiros a sugerir o termo “lipossoma” para estas vesículas lipídicas que eram apelidadas de *smectic mesophages*. (Bangham and Horne 1964).

A sua estrutura é conferida devido à natureza anfipática dos fosfolípidos, que se caracterizam por uma região polar ou hidrofílica, capaz de interagir com a água, e uma região apolar ou hidrofóbica, constituída por uma ou duas cadeias carbonadas. Desta forma, permitem a encapsulação (figura 2) de substâncias hidrofílicas no compartimento aquoso e a incorporação de substâncias hidrofóbicas na camada lipídica (Frézard 1999).

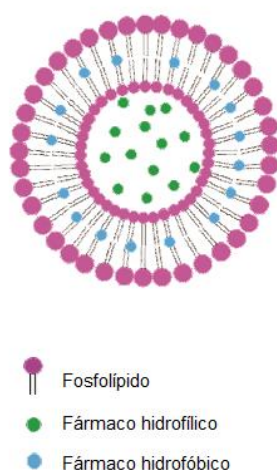


Figura 2: Representação esquemática de um lipossoma unilamelar e os seus componentes. Adaptado de (Banerjee et al. 2015).

As vantagens associadas ao seu uso são a biocompatibilidade, biodegradabilidade, flexibilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade, para além da sua capacidade de encapsular/incorporar moléculas (Banerjee et al. 2015). Quanto à molécula encapsulada, são capazes de lhe conferir estabilidade, aumentar a especificidade para o local de atuação, diminuir a sua toxicidade para o organismo, assim como, protege-la da inativação efetuada pelo meio (Mozafari 2010). As desvantagens prendem-se com o seu custo de produção, possibilidade de se perder substância aquando da fusão do lipossoma, tempo de semi-vida curto e baixa solubilidade (Anwekar et al. 2011). Para além disso, os lipossomas estão vulneráveis à eliminação da circulação sanguínea pelas células do sistema reticulo-endotelial (SRE). Este sistema é responsável pela eliminação de macromoléculas estranhas ao organismo através da ação dos macrófagos do fígado, baço e sistema linfático (Torchilin 2005). Um estudo de Laverman et al. (2001) mostrou que após 15 a 30 minutos da administração dos lipossomas, por via endovenosa, 50 a 80% da dose tinha sofrido absorção pelas células do SRE, sendo que as células de kupffer do fígado são as primeiras a capturar os lipossomas.

Existem diversas aplicações possíveis para os lipossomas, nas áreas da imagiologia, como agentes de entrega de contraste para diversos exames complementares de diagnóstico (Torchilin 1996), da cosmética, pela capacidade de penetração na pele (Hoogevest and Fahr 2019) e segurança alimentar (Carrillo-Inungaray et al. 2018), no entanto, a sua maior utilização é como veículo de transporte e entrega de fármacos, como por exemplo antibióticos ou quimioterápicos (Park 2002; Huh and Kwon 2011).

2.7.1 Propriedades Físico-Químicas dos Lipossomas

As propriedades dos lipossomas relacionadas com tamanho, carga à superfície, composição lipídica e capacidade de incorporação de moléculas são bastante versáteis (Solaro et al. 2010).

- **Tamanho**

Na maioria, o diâmetro médio dos lipossomas varia entre 0,05 e 5,0 μm (Bangham and Horne 1964). Este é um parâmetro determinante, pois influencia a farmacocinética, distribuição e *clearance* dos lipossomas (Kraft et al. 2014). O período de circulação do lipossoma na corrente sanguínea, ou seja, o seu tempo de semi-vida é variável, tendo em consideração que os lipossomas de menor dimensão ($< 0,1 \mu\text{m}$) sofrem opsonização mais lentamente pelo SRE, quando comparados com os lipossomas de maior dimensão ($> 0,1 \mu\text{m}$) (Sharma A and Sharma U 1997). Com base nestes dados, podemos concluir que a velocidade de eliminação dos lipossomas pelo SRE aumenta proporcionalmente com o tamanho dos mesmos.

- **Carga Superficial**

O mecanismo da interação entre o lipossoma e a célula pode ser influenciado pela natureza e densidade da carga à superfície dos lipossomas. Ambas podem ser alteradas através da modificação da composição lipídica. Quando a carga superficial é neutra, os lipossomas não interagem significativamente com as células. Os lipossomas de carga eletrostática positiva à superfície promovem interação lipossoma-célula, entregando o seu conteúdo através de fusão (Sharma A and Sharma U 1997). No caso de ser negativa, os lipossomas são predominantemente capturados por endocitose (Sharma and Straubinger 1994). A carga à superfície do lipossoma é medida através do potencial zeta e resulta da diferença entre o potencial elétrico da superfície membranar e do meio de dispersão iónico (Kraft et al. 2014).

- **Fluidez da Bicamada**

Os lípidos têm uma temperatura de fase de transição (T_c) característica. Lípidos de elevada T_c ($> 37^\circ\text{C}$) estão associados a uma menor fluidez da membrana à temperatura

ambiente, enquanto que lípidos de baixa T_c ($< 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) estão mais sujeitos a perder o seu conteúdo à temperatura ambiente (Sharma A and Sharma U 1997).

Para além dos fosfolípidos que fazem parte da composição base dos lipossomas, podem ser incluídos outros constituintes na sua camada lipídica, como por exemplo, colesterol, de forma a alterar a fluidez do lipossoma (Sharma A and Sharma U 1997).

- **Estabilidade dos Lipossomas**

O aumento do tamanho do lipossoma, a razão entre a composição lipídica e o agente encapsulado, a fusão e agregação das bicamadas da membrana ou dispersão de materiais encapsulados são causas físicas para a instabilidade dos lipossomas. A estabilidade física pode ser melhorada através do armazenamento de lipossomas a baixas temperaturas. Por outro lado, a instabilidade química está associada à hidrólise ou oxidação dos lípidos. (Alhariri et al. 2013). A liofilização dos lipossomas pode ser um processo de melhoramento da estabilidade física e química a longo prazo (Ingvarsson et al. 2011).

2.7.2 Classificação dos lipossomas

a) Com base na estrutura

Podem ser classificados em duas categorias, vesículas multilamelares (MLV, *MultiLamellar Vesicles*) e unilamelares, de acordo o número de camadas (figura 3). As últimas podem ser sub-classificados, tendo em conta o tamanho, em gigantes (GUV, *Giant Unilamellar Vesicles*), grandes (LUV, *Large Unilamellar Vesicles*) e pequenas (SUV, *Small Unilamellar Vesicles*) (figura 3). Enquanto que as vesículas unilamelares têm apenas uma camada fosfolipídica em redor de um compartimento aquoso, os lipossomas multilamelares adquirem uma estrutura onde vários lipossomas unilamelares se formam no interior de um outro lipossoma, dando origem a camadas concêntricas de fosfolípidos, separadas por camadas de meio aquoso (Akbarzadeh et al. 2013).



Figura 3: Classificação dos lipossomas segundo tamanho e número de camadas. Adaptado de Alhariri et al. 2013.

Legenda: MLVs - Vesículas Multilamelares; LUVs - Vesículas unilamelares grandes; SUVs - vesículas unilamelares pequenas.

b) Com base na constituição da bicamada fosfolipídica

• Lipossomas convencionais

A sua estrutura é simples (figura 4). São compostos por fosfolípidos de carga neutra e/ou negativa, com ou sem colesterol na sua constituição. São caracterizados pelo seu curto tempo de semi-vida e rápida acumulação nos macrófagos. Uma das suas aplicações está relacionada com entrega de fármacos direcionados ao sistema mononuclear fagocítico (Storm and Crommelin 1998).

• Lipossomas de longa circulação

Estes lipossomas foram desenvolvidos na medida em que era necessário ultrapassar as desvantagens associadas aos lipossomas convencionais, ou seja, o tempo de semi-vida reduzido, associado à sua rápida e eficiente eliminação pelos macrófagos. Outra vantagem apresentada por estes lipossomas é a sua capacidade de extravasar nos locais do organismo onde a permeabilidade vascular se encontra aumentada, como ocorre nas situações de inflamação, infeção e locais próximos de tumores sólidos (Storm and Crommelin 1998).

Existem várias estratégias para o desenvolvimento deste tipo de lipossoma, no entanto, a que apresentou mais sucesso consiste numa ligação covalente entre a superfície dos lipossomas convencionais e um polímero de polietilenoglicol (PEG) (figura 4). Este revestimento hidrófilo dos lipossomas permite a criação de uma barreira entre o lipossoma e o meio envolvente, prevenindo o seu reconhecimento pelo SRE (Milla et al. 2011).

• Lipossomas Catiónicos

Inicialmente, foram desenvolvidos com o objetivo de transportar e entregar material genético, com o intuito de serem aplicados na terapia genética (Torchilin 2005). São constituídos por, pelo menos, um lípido sintético com carga positiva, que interage e neutraliza os ácidos nucleicos de carga negativa que se encontram encapsulados (figura 4). O complexo lipídico formado, lípido-DNA, confere proteção e promove uma internalização e expressão celular mais específica (Storm and Crommelin 1998).

• Imunolipossomas

Lipossomas (convencionais, catiónicos ou de longa circulação) cuja superfície foi modificada (figura 4) pela adição de anticorpos específicos ou fragmentos dos mesmos à membrana superficial, com o objetivo de melhorar a especificidade na entrega do fármaco encapsulado (Storm and Crommelin 1998). As imunoglobulinas G e os seus fragmentos são as mais utilizadas na produção deste tipo de lipossomas, ligando-se covalentemente à superfície, sem que a integridade e as propriedades do anticorpo sejam afetadas (Eloy et al. 2017).

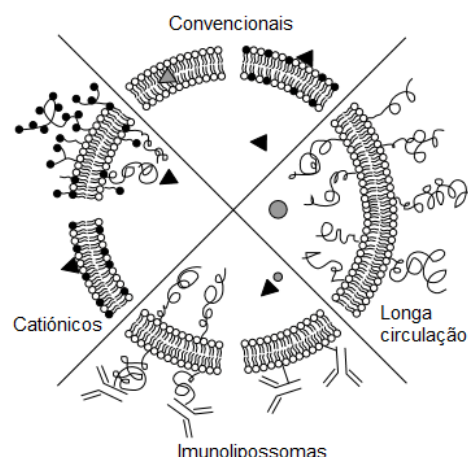


Figura 4: Representação esquemática dos quatro principais tipos de lipossomas: convencionais, longa circulação, imunolipossomas e catiónicos. Adaptado de (Storm and Crommelin 1998).

2.7.3 Interação entre Lipossoma e Bactérias

O interesse nos lipossomas baseia-se na sua estrutura biológica, semelhante à membrana celular, e no facto de, para além de impedirem que o seu conteúdo seja libertado rapidamente, terem a capacidade de interagir com células do hospedeiro de diversas formas, incluindo adsorção, endocitose ou fusão. Na figura 5 estão representadas as possíveis interações entre lipossomas e bactérias (Alhariri et al. 2013).

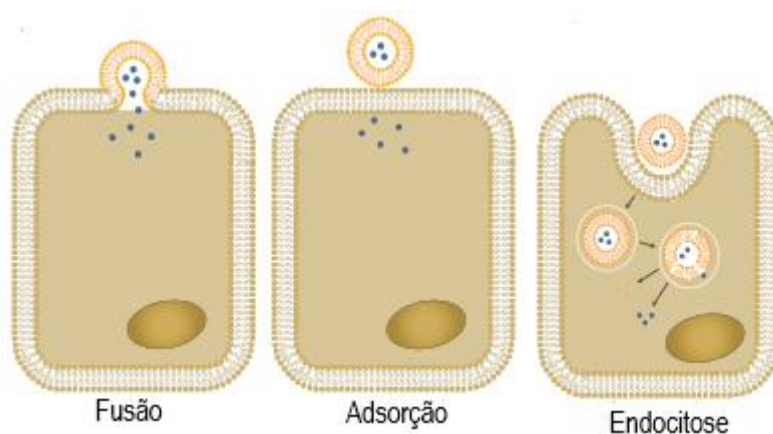


Figura 5: Representação esquemática dos diferentes mecanismos de interação possíveis entre um lipossoma e bactéria alvo. Adaptado de (Alhariri et al. 2013).

- **Fusão**

Ocorre um contacto próximo entre o lipossoma e a membrana celular, o que leva a que ocorra mistura e difusão entre os lípidos de ambos, permitindo que as moléculas encapsuladas no compartimento aquoso dos lipossomas sejam diretamente libertadas para o citoplasma celular (Sachetelli et al. 2000).

- **Adsorção**

Esta interação ocorre devido às forças atrativas, como por exemplo, interações eletrodinâmicas, ou à ligação entre ligandos presentes na superfície do lipossoma e os recetores específicos na superfície da célula. Após a adsorção do lipossoma, o material encapsulado é libertado no meio extracelular e a sua entrada na célula ocorre por difusão passiva, através de gradiente de concentrações. Importante salientar que, em nenhum momento ocorre fusão dos lipossomas com a membrana celular (Alhariri et al. 2013).

- **Endocitose**

As células têm capacidade para envolver moléculas exteriores, através de prolongamentos da membrana plasmática que formam uma invaginação em seu redor, capturando os lipossomas, posteriormente levando à formação de endossomas. Estas vesículas recém-formadas vão fundir-se com os lisossomas, resultando na formação de fagossomas. As enzimas lisossómicas, que se encontram no interior do lisossomas, são responsáveis pela digestão dos lípidos e, indiretamente, pela libertação do conteúdo dos lipossomas no espaço intracelular (Hillaireau and Couvreur 2009).

2.7.4 Vias de administração

Os agentes transportados por lipossomas podem ser introduzidos num sistema biológico por via oral, intravenosa ou pulmonar (Alhariri et al. 2013).

A via de administração oral é, por norma, a preferencial devido à segurança e facilidade que lhe estão associadas. Os medicamentos lipofílicos têm uma fraca dissolução em água, mas no meio gastrointestinal são frequentemente solubilizados pela biliar. Assim, lipossomas administrados por esta via, que possuam uma grande área superficial, permitem que a lipase pancreática os hidrolise, promovendo a solubilização no lúmen gastrointestinal (Elgart et al. 2012). Ao optar pela via de administração endovenosa, o lipossoma fica exposto à rápida eliminação, na corrente sanguínea, pelo SRE, sendo necessário recorrer a estratégias, como por exemplo, conjugação de PEG à superfície do lipossoma, para que o seu tempo de semi-vida possa ser prolongado (Torchilin 2005). Os agentes ativos encapsulados em lipossomas podem, ainda, ser entregues diretamente no pulmão, para tratamento local, permitindo o uso de doses mais baixas e de toxicidade reduzida. Neste caso, a sua via de administração ocorre através de nebulização em forma de gotículas ou inalação de pó seco (Brück et al. 2001).

2.7.5 Método de preparação

Existem várias técnicas de preparação/encapsulação que, na sua maioria, podem ocorrer de forma passiva, se o fármaco é encapsulado durante a formação do lipossoma, ou ativa, quando a incorporação ocorre após a formação do lipossoma. Apesar das diferenças,

estas técnicas têm em comum a secagem dos lípidos a partir de solventes orgânicos, a dispersão do lípido em meio aquoso, redimensionamento dos lipossomas e purificação/limpeza da suspensão lipossomal, a etapa crucial de todo o processo (Akbarzadeh et al. 2013).

- **Método Desidratação-Reidratação**

Este método consiste na desidratação seguida de reidratação dos lipossomas, obtendo-se vesículas designadas DRV (*Dehydration-Rehydration Vesicles*). Inicia-se pela evaporação do solvente num evaporador rotativo, conduzindo à formação de um filme lipídico uniformemente distribuído pelas paredes do balão. A hidratação desse filme com uma solução aquosa, leva à formação dos lipossomas. De seguida, esta suspensão é congelada e liofilizada e, por fim, reidratada de forma controlada (Kirby and Gregoriadis 1984).

- **Método Fase Reversa**

As vesículas obtidas são denominadas REV (*Reverse-phase Evaporation Vesicles*). O procedimento consiste em preparar uma emulsão de água numa solução oleosa. A fase aquosa é composta pelo fármaco a incorporar e a fase lipídica é constituída por um solvente orgânico, onde se encontram solubilizados os componentes lipídicos. Depois de obtida a emulsão, o solvente orgânico é removido por evaporação em condições de baixas pressões, resultando numa dispersão aquosa de lipossomas com o fármaco encapsulado (Szoka and Papahadjopoulos 1978). Neste método há a encapsulação de mais de 50% do soluto (Frézard 1999).

3. Parte Prática

3.1 Objetivo de Estudo

O tratamento das infeções urinárias causadas por bactérias multirresistentes tem se revelado um desafio. Na maioria destas situações, os clínicos já não dispõem de antibióticos disponíveis ou outras alternativas para tratar a infeção. No caso de ser dada alta clínica, os animais tornam-se numa preocupação para a saúde pública, sendo que, na maioria das vezes o desfecho destes casos é a eutanásia.

De forma a desenvolver uma solução para melhorar as hipóteses de tratamento das infeções causadas pelas bactérias MDR, tem-se procurado alternativas ou novas abordagens aos antibióticos, tendo em conta que, nos últimos anos, a descoberta de novas moléculas antimicrobianas tem se mostrado infrutífera.

Em relação às novas abordagens, os lipossomas têm-se revelado uma alternativa em várias áreas, devido às suas características relacionadas com a biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Uma das aplicações mais documentadas é a sua utilização no tratamento de diferentes tipos de cancro, de modo a substituir ou complementar

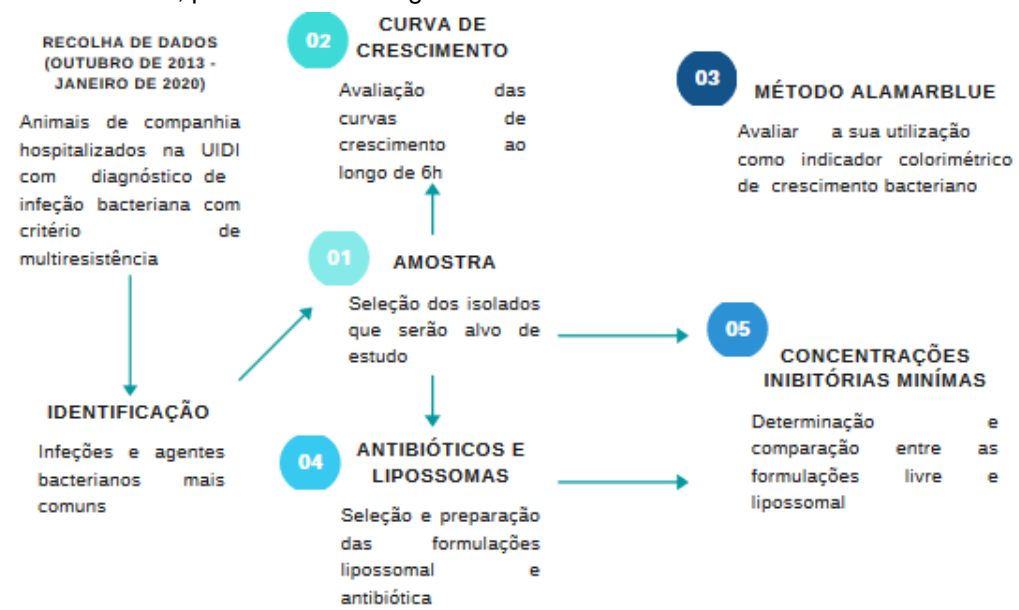
os tratamentos que recorrem a quimioterápicos (Park 2002; Torchilin 2005). A sua utilização também foi estudada como possibilidade de aplicação no tratamento de doenças infecciosas (Alhariri et al. 2013). Com base nas vantagens apresentadas pela encapsulação de moléculas em lipossomas e na evidência científica apresentada, equacionou-se a possibilidade da sua utilização como veículo de transporte de antibióticos, com o objetivo de ultrapassar as resistências antimicrobianas. Num estudo anterior, desenvolvido no mesmo laboratório, realizado por Ögren (2020), foram desenvolvidas formulações lipossomais com o objetivo de otimizar o processo de incorporação de antibióticos. Apesar de se ter conseguido desenvolver lipossomas com bons níveis de incorporação e estabilidade, o efeito antimicrobiano observado não igualou a atividade do antibiótico livre. Assim, no presente estudo, pretendeu-se investigar se, ao encapsular antibióticos em lipossomas com propriedades fusogénicas, a sua atividade antimicrobiana é melhorada.

Foram então desenvolvidas novas formulações lipossomais de ceftriaxona (CTX) tendo-se determinado a sua atividade antimicrobiana, *in vitro*, comparativamente com a ceftriaxona (CTX) livre. A escolha deste antibiótico está relacionada com a maioria das estirpes clínicas serem multirresistentes e com a disponibilidade imediata (em stock) para a formulação dos lipossomas. Para validar a eficácia das formulações lipossomais, foram utilizadas estirpes clínicas de animais de companhia hospitalizados na UICB do HEV, com diagnóstico confirmado de ITU pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária.

As diferentes etapas do estudo (gráfico 1) são as seguintes:

1. Seleção das estirpes e da amostra: foi realizada uma caracterização geral da população de animais de companhia internados na UICB com diagnóstico ou suspeita de infeção bacteriana, com critério de multirresistência. Assim, foi possível identificar os agentes bacterianos e o tipo de infeção bacteriana mais frequentes, de forma a direcionar o estudo. Com base nesta identificação, foi feita a escolha das estirpes sujeitas ao presente estudo;
2. Avaliação das curvas de crescimento das estirpes clínicas selecionadas;
3. Validação do método AlamarBlue: este reagente é utilizado com o objetivo de evidenciar e esclarecer o crescimento bacteriano.
4. Seleção e preparação das soluções antimicrobianas livre e lipossomal;
5. Determinação e comparação das CMI das formulações livre e lipossomal de ceftriaxona (CTX)

Gráfico 1: Desenho de Estudo: representação esquemática das diferentes etapas do presente estudo, por ordem cronológica do seu desenvolvimento.



3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Recolha de Dados e Amostra

A população geral em estudo é composta por 72 animais de companhia que estiveram hospitalizados na UICB, entre outubro de 2013 e janeiro de 2020, por diagnóstico de infeção bacteriana com suspeita de multirresistência. A população alvo consistiu em 33 animais de companhia com diagnóstico confirmado de ITU.

Foi construído um banco de dados, com recurso ao programa Microsoft® Office Excel 365 para Windows®, com a informação referente à história pregressa e situação clínica de cada um destes animais (espécie, género, idade, tipo de infeção, agente etiológico, antibioterapia utilizada, desfecho do caso clínico e follow-up). Estas informações foram obtidas através de uma base de dados geral, que contém os dados de todos os animais internados, existente na UICB, e pesquisa nos programas informáticos hospitalares “QVet”, “GuruVet” e “Pet Universal”. A análise descritiva dos dados recolhidos foi feita através do programa Graph Pad Prism 8.

A amostra para o trabalho experimental (tabela 4) consiste em 13 estirpes clínicas (10 de *Escherichia coli*, 3 de *Klebsiella pneumoniae*) obtidas durante o internamento dos animais na UICB, para obtenção de um diagnóstico definitivo, através de cistocentese ou algaliação, de forma a minimizar a contaminação, e armazenadas a -4 °C, com a devida identificação. Estas estirpes foram submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, pelo laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, e os seus resultados foram obtidos através do registo eletrónico. As estirpes clínicas

foram classificadas como MDR nos casos de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

Tabela 4: Informação relativa aos animais (espécie, género, idade, tipo de infeção, estirpes isoladas, antibioterapia utilizada, desfecho do caso clínico e *follow-up*) dos quais foram obtidas as amostras de urina de onde foram possíveis isolar as estirpes clínicas testadas no presente estudo.

Nº	ESPÉCIE	GÉNERO	IDADE (ANOS)	TIPO ITU	ESTIRPES ISOLADAS	RESISTÊNCIA	AB	DESFECHO CLÍNICO	FOLLOW-UP
22/22-1	Felídeo	F	9	Cistite	<i>K. pneumoniae</i> (2 isolados)	Suscetível	Marbofloxacina	Alta	Saudável
126	Canídeo	F	14	Cistite recorrente	<i>E. coli</i>	MDR	Doxiciclina	Eutanásia	-----
256	Felídeo	M	16	Cistite recorrente	<i>K. pneumoniae</i>	MDR	Marbofloxacina	Eutanásia	-----
491-1/491-2	Canídeo	F	11	Cistite	<i>E. coli</i> (2 isolados)	MDR	Enrofloxacina	Eutanásia	-----
500	Felídeo	F	15	Pielonefrite	<i>E. coli</i>	Suscetível I	Cefalexina	Alta	Eutanásia
527	Canídeo	F	4	Pielonefrite	<i>E. coli</i>	MDR	Sulfametoxazol + Trimetoprim	Alta	Eutanásia
613	Felídeo	F	9	Cistite	<i>E. coli</i>	Suscetível	AMC	Alta	Desconhecido
537	Felídeo	F	13	Cistite	<i>E. coli</i>	Suscetível	AMC	Alta	Crónico
26	Canídeo	F	16	Cistite recorrente	<i>E. coli</i> (ESBL +)	MDR	AMC	Eutanásia	-----
682	Felídeo	M	5	Cistite	<i>E. coli</i>	MDR	AMC	Alta	Desconhecido
1069	Canídeo	M	10	Cistite recorrente	<i>E. coli</i>	MDR	AMC	Eutanásia	-----

Legenda: Nº- Número da análise; F- Feminino; M- Masculino; ITU- Infeção do Trato Urinário; ESBL- Extended-Spectrum β -Lactamases; AB- Antibiótico; MDR- Multi-drug Resistant; AMC- Associação Amoxicilina e Ácido clavulânico

Para além das estirpes clínicas obtidas, foi utilizada uma estirpe de *E. coli* de referência (ATCC 25922) como controlo de qualidade dos ensaios laboratoriais.

Por forma a desenvolver colónias isoladas e puras, as amostras previamente conservadas a -4 °C foram inoculadas em meio agar Columbia suplementado com 5% de sangue de ovelha, através da técnica de esgotamento em estria, e incubadas a 37 °C durante a noite. Após incubação, foram conservadas em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 20% de glicerol a -80 °C.

3.2.2 Evolução das Curvas de Crescimento

Para algumas das estirpes clínicas foi traçada uma curva de crescimento com o objetivo de avaliar as condições ideais de desenvolvimento, analisar e identificar as quatro fases de crescimento microbiano e averiguar se existem diferenças entre as estirpes classificadas como MDR e suscetíveis.

Uma colónia foi colhida da placa de agar e inoculada em meio de crescimento líquido em tubo de ensaio. Para as estirpes de *E. coli* o meio de cultura escolhido é o LB e para as de *K. pneumoniae* o meio é o TSB (Ögren 2020). A densidade óptica (DO) das células em suspensão foi medida a 600nm durante seis horas, a cada meia hora, utilizando um espectrofotómetro (Ultrospec®10). Durante este período, os tubos de ensaio mantiveram-se

na estufa a 37 °C. Estabeleceu-se uma DO inicial de 0,1 para as estirpes de *E. coli* e de 0,2 para as de *K. pneumoniae* (Ögren 2020).

Este protocolo foi realizado em triplicado, em três ensaios independentes, e as colónias tiveram sempre origem em placas novas, de forma a garantir a consistência dos resultados. As DO foram registadas em forma de tabela no programa Microsoft® Office Excel 365 para Windows®, onde foi feita a média dos valores dos três ensaios. As curvas de crescimento foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism 8.

3.2.3 Preparação dos Lipossomas: incorporação ativa

As soluções de ceftriaxona, livre e lipossomal, necessárias para este estudo foram preparadas no Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galénica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, com o auxílio da Doutora Maria Manuela Gaspar e a Dr^a Magda Ferreira. Neste trabalho foi utilizado o método de incorporação ativa para a preparação dos lipossomas.

- **Preparação do filme lipídico**

Os lipossomas desenvolvidos são compostos por 3 lípidos: DOPE (Dioleoilfosfatidiletanolamina), PC (Fosfatidilcolina) e CHEMS (Hemissuccinato de Colesterila) (tabela 5). Esta é uma formulação lipossomal com propriedades fusogénicas.

Estes lípidos foram dissolvidos em clorofórmio e a mistura foi colocado num evaporador rotativo, de forma a ocorrer a evaporação do solvente orgânico até à formação de um filme lipídico. Este filme foi hidratado com água e colocado em tubos de congelação, a -80 °C e deixado a liofilizar durante a noite.

Tabela 5: Resumo das principais características físico-químicas dos lipossomas com propriedades fusogénicas, desenvolvidos através do método de incorporação ativa.

A B	Composição lipídica (rácio)	Tampão interior do lipossoma	Tampão exterior do lipossoma	[AB/Lip] inicial nmol/ μmol	[AB/Lip] final nmol/ μmol	E.E (%)	Ø (nm)
C T X	PC:DOPE:CHEMS (4:4:2)	Sulfato de Amónio + 5% Trialose	Citrato	155	10	6	135 ± 1 (<0.1)
V a z i o s	PC:DOPE:CHEMS (4:4:2)	---	Citrato	---	---	---	123 ± 1 (<0.1)

Legenda: AB- Antibiótico; CTX- Ceftriaxona; PC- Fosfatidilcolina; DOPE- Dioleoilfosfatidiletanolamina; CHEMS- Hemissuccinato de Colesterila; Lip- Lípido; E.E- Eficácia de encapsulação; Ø - diâmetro

- **Extrusão dos lipossomas e Filtração em coluna de gel**

O conteúdo dos tubos de congelação foi reidratado, no caso da formulação lipossomal, com o tampão sulfato de amónio, e no caso da formulação livre, com tampão citrato. De seguida, as suspensões lipossomais foram extrusadas através de membranas de polycarbonato com os tamanhos de poros 0.6 (2x); 0.4 (2x); 0.2 (3x); 0.1 (6-8x) μL , utilizando o equipamento Extruder (Lipex: Biomembranes Inc., Vancouver, British Columbia, Canada), até atingir um tamanho próximo de 100nm.

Através da filtração numa coluna de gel PD-10 (Econo-Pac® 10DG; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), o tampão extralipossomal da formulação que será incubada com a ceftriaxona foi alterado para o tampão citrato.

- **Incubação, Ultracentrifugação e Ressuspensão**

A solução de ceftriaxona foi colocada a incubar com os lipossomas durante 1 hora, em banho maria (aproximadamente 30 °C). Esta formulação foi submetida ao processo de ultracentrifugação (equipamento: Beckman LM-80 ultracentrifuge (Beckman Instruments, Inc, USA), 250,000 g - 49000 rpm durante 1 h 45 min, a uma temperatura de 15 °C, de forma a separar a ceftriaxona não incorporada nos lipossomas. O *pellet* que resultou da ultracentrifugação foi ressuspendido no tampão extralipossomal.

- **Caracterização dos lipossomas**

Os lipossomas são caracterizados tendo em conta a sua composição lipídica, o rácio inicial e final antibiótico/lípido e a eficácia de encapsulação.

A quantificação lipídica da formulação foi determinada através do método de quantificação de fosfolípidos, baseado numa determinação colorimétrica dos grupos fosfato (PO_4^{3-}). Na presença de heptamolibedato de amónio $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ o fosfato inorgânico é convertido a ácido fosfomolibdico, que é quantitativamente convertido para uma cor azul, devido à redução do ácido ascórbico durante o aquecimento (Rouser et al. 1970).

Quando se pretende quantificar o antibiótico, é construída uma reta de calibração (gráfico 2). Para esta reta foram criados 6 padrões de concentrações diferentes e crescentes (tabela 6) e todas as diluições dos padrões e amostras são realizadas em duplicado.

Em ambas as quantificações, os tubos foram levados a evaporar em placa térmica, a 180 °C. De seguida, foi adicionado 0,3 ml de ácido perclórico em todos os tubos e colocados novamente na placa a 180 °C durante 1 hora. Ao fim deste tempo, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente, onde se juntou 1 ml de H_2O , 0,4 ml de hexa-molibdato de amónio e 0,4 ml de ácido ascórbico, e colocados em banho a 100 °C, durante 5 minutos.

A absorvância foi lida num comprimento de onda de 241 nm no método de quantificação da ceftriaxona e a 797 nm no método de quantificação dos fosfolípidos (UV-mini 1240 Spectrophotometer - Shimadzu). Recorrendo ao Microsoft® Office Excel 365, foi

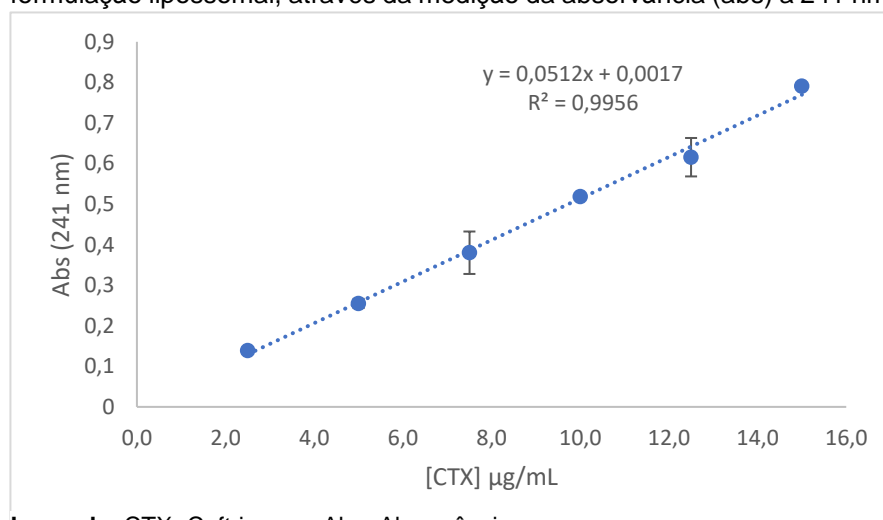
construída a reta de calibração, tendo em conta a média dos valores da absorvância para cada concentração definida.

Tabela 6: Valores de absorvância (241 nm) da solução de CTX, correspondente média e desvio padrão para cada padrão definido (P1-P6), para formulação da reta de calibração na quantificação da ceftriaxona.

Padrões	CTX µg/mL	Volume Solução Stock (µl)	Volume etanol (µl)	Abs (241 nm)		MED	SD
P1	2,5	10	990	0,140	0,137	0,139	0,0021
P2	5,0	20	980	0,247	0,263	0,255	0,0113
P3	7,5	30	970	0,417	0,343	0,380	0,0523
P4	10,0	40	960	0,517	0,520	0,519	0,0021
P5	12,5	50	950	0,649	0,582	0,616	0,0474
P6	15,0	60	940	0,786	0,795	0,791	0,0064

Legenda: CTX- Ceftriaxona; Abs- Absorvância; MED- Média; SD- Desvio padrão

Gráfico 2: Reta de calibração para quantificação da ceftriaxona na formulação lipossomal, através da medição da absorvância (abs) a 241 nm.



Legenda: CTX- Ceftriaxona; Abs- Absorvância

3.2.4 Teste de suscetibilidade aos antibióticos

1. Método das microdiluições

Através do método de microdiluição em meio líquido, foram determinadas as CMI das formulações livre e encapsulada da ceftriaxona, seguindo os métodos padronizados pelo EUCAST (2003).

O ensaio desenvolve-se numa placa de microdiluição de 96 poços, de forma a identificar a menor concentração (µg/mL) de antibiótico livre e encapsulado onde não é possível identificar o crescimento bacteriano, ou seja, identificar a CMI para esse antibiótico nas duas formulações testadas.

Neste ensaio não é possível identificar o crescimento bacteriano através da turvação do meio, devido à coloração branca das preparações lipossomais. Assim, é necessário recorrer a um método colorimétrico como o AlamarBlue®, que contém um indicador de oxidação-redução.

2. Preparação das soluções antimicrobiana e bacteriana

Foram efetuadas diluições seriadas de 1:2, em solução salina 0,9%, das formulações livre e lipossomal de ceftriaxona, com uma concentração inicial e final de 24 µg/mL e 0,09375 µg/mL, respetivamente.

O inóculo foi preparado através da seleção de colónias diretamente da placa de meio agar Columbia, com recurso a uma ansa estéril descartável, em cerca de 10 ml de meio líquido, LB ou TSB.

A suspensão deve ter uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a uma densidade óptica de 0,2, quando medida através de um espectrofotómetro, a 600nm. Esta suspensão inicial sofre uma nova diluição, onde 0,1 ml do inóculo foi transferido para um novo tubo de ensaio que contém 9,9 ml de meio de cultura líquido, dando origem a uma densidade celular de 1×10^5 UFC/ml (EUCAST 2003). Assim, no momento da microdiluição em placa, quando forem adicionados iguais volumes da preparação antimicrobiana (livre e lipossomal) e inóculo, a densidade celular final será de 5×10^5 UFC/ml (EUCAST 2019).

3. Preparação da placa de microdiluição

A placa de microdiluição é efetuada numa placa de 96 poços, que foi identificada com as várias diluições e os controlos positivos e negativos (figura 6). O volume final de todos os poços é de 200 µl.

Em cada um dos poços foi colocado 100 µl das diluições antimicrobianas (formulação livre e lipossomal), nas concentrações correspondentes, e um volume equivalente de suspensão bacteriana. O controlo positivo consistiu em 100 µl da suspensão do inóculo e 100 µl de meio de cultura, e o controlo negativo em 200 µl de meio de cultura. A formulação dos lipossomas livres também foi testada, numa única concentração (24 µg/ml), de forma a avaliar a sua influência no crescimento bacteriano. Para tal, foram colocados 100 µl da solução de lipossomal vazia e 100 µl de suspensão bacteriana e um controlo negativo onde se colocou 200 µl da solução lipossomal. Para cada formulação antimicrobiana testada, o procedimento foi realizado em triplicado. Depois de completadas as inoculações, a placa foi selada com Parafilm® e incubada a 37 °C durante 16 a 20 horas (durante a noite).

24 µg/ml	12 µg/ml	6 µg/ml	3 µg/ml	1,5 µg/ml	0,75 µg/ml	0,375 µg/ml	0,1875 µg/ml	0,09375 µg/ml		LIP -	LIP +
CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX		LIP -	LIP +
CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX		LIP -	LIP +
CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX	CTX			
LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX			
LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP+CTX	LIP CTX	LIP CTX			
LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX	LIP CTX			
C -	C -	C -		C +	C +	C +					

Figura 6: Representação esquemática da disposição das formulações lipossomal e livre, nas diferentes concentrações, na placa de microdiluição.

Legenda: CTX- Formulação livre; LIP CTX- Formulação lipossomal; C⁻ - Controlo negativo; C⁺ - Controlo positivo; Lip⁻ - Controlo negativo da formulação vazia; Lip⁺ - Controlo positivo da formulação vazia

4. Utilização do AlamarBlue®

O ensaio de proliferação celular foi realizado com objetivo de avaliar a viabilidade microbiana na placa de microdiluição. A técnica utilizada foi baseada no protocolo utilizado pelos laboratórios da Bio-Rad.

O AlamarBlue® é um reagente fotossensível, de cor azul, que indica a viabilidade celular através da quantificação da proliferação das células bacterianas. Contém um indicador de oxi-redução, a resazurina, que muda de cor quando há crescimento celular. Altera-se do seu estado oxidado (resazurina), de cor azul, para o estado reduzido (resofurina) de cor vermelha/rosa (Bio-Rad Laboratories 2018).

A cada poço da placa, incluindo os controlos negativos e positivos, foi adicionada a quantidade correspondente a 10% do total do volume do poço, ou seja, 20 µl do reagente AlamarBlue®. De seguida, a placa foi incubada a 37 °C durante duas horas, protegida da luz.

Após o tempo de incubação, o crescimento bacteriano fica evidenciado pela mudança da coloração dos poços, de azul para rosa/vermelho. As CMI correspondem à menor concentração de antibiótico onde não se observa mudança de cor, ou seja, mantém a cor azul. Para confirmar as CMI, foi medida a absorvância de cada poço, por espectrofotometria (SpectraMAX 340 pc), nos comprimentos de onda de 570 e 600nm. Através destes valores foi possível calcular a diferença percentual entre os poços tratadas (inóculo com antibiótico) e os poços do controlo positivo (inóculo sem antibiótico), utilizando a equação 1 (Bio-Rad Laboratories 2018):

Equação 1: Cálculo da Viabilidade Celular: Tratado Vs. Não tratado.

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)} \times 100$$

Legenda: O1- Coeficiente de extinção molar (E) do AlamarBlue® oxidado a λ= 570nm; **80586** (valor tabulado); O2- Coeficiente de extinção molar (E) do AlamarBlue® oxidado a λ= 600nm; **117216** (valor tabulado); A1- Absorvância dos poços tratados a λ= 570nm; A2- Absorvância dos poços tratados a λ= 600nm; P1- Absorvância dos poços do controlo positivo a λ= 570nm; P2- Absorvância dos poços do controlo positivo a λ= 600nm

Depois de resolvida a equação 1, os valores obtidos indicam a viabilidade celular (%) de cada poço. Estas percentagens foram relacionadas através de gráficos, criados com recurso ao programa Graph Pad Prism8, com as concentrações crescentes de solução antibiótica (livre e encapsulada).

3.2.5 Validação do método AlamarBlue

De forma a validar a utilização do reagente AlamarBlue® como indicador de viabilidade celular, tentou-se estabelecer uma correlação entre a viabilidade celular e a redução do reagente. Para tal, foi determinada a viabilidade celular, a densidade óptica (DO) e a contagem de unidades formadoras de colónia (UFC) em meio de cultura sólido.

1. Curva de Crescimento

Uma colónia de *E. coli* ATCC foi colhida da placa de agar-sangue e inoculada em meio de crescimento líquido LB num tubo de ensaio, de forma a que a DO inicial fosse 0,1. A DO das células em suspensão foi medida a 600nm durante seis horas, a cada meia hora, utilizando um espectrofotómetro (Ultrospec®10). Durante este período, os tubos de ensaio foram mantidos, na estufa, a 37 °C.

2. Crescimento bacteriano e AlamarBlue

Foram estabelecidos dez *timepoints* (T0-T9) para este ensaio. A cada *timepoint* foram transferidos 100 µl da solução bacteriana (preparada inicialmente e que se mantém na estufa durante todo o processo a 37 °C) em dois poços da placa, sendo que num deles foi adicionado 10 µl de AlamarBlue® (10% do volume do poço). Foi ainda acrescentado um controlo negativo, onde se colocou 100 µl meio de cultura e 10 µl de AlamarBlue.

Entre T0 e T1 decorreu uma hora e entre os *timepoints* seguintes decorreram 30 minutos. A placa foi analisada por espectrofotometria, nos comprimentos de onda de 570 e 600nm, uma hora após ter sido incubada na placa. Através destes valores foi possível calcular a diferença percentual entre os poços tratadas e os poços do controlo positivo, utilizando a equação 1, anteriormente descrita. Os resultados foram relacionados através de gráficos criados com recurso ao programa Graph Pad Prism8.

3. Contagem de UFC

Para a contagem de UFC foi necessário proceder a diluições seriadas em solução salina 0,9%. A diluição 10^{-1} corresponde a 900 µl de meio de diluição e 100 µl de da solução bacteriana preparada em tubo de ensaio, sendo que as restantes diluições são efetuadas retirando 100 µl da diluição anterior. A cada *timepoint* (T0-T9) correspondem 3 diluições que estão descritas na tabela 7. Em cada placa de meio LB agar foram inoculados 100 µl da diluição, através do método de espalhamento.

As placas foram colocadas a incubar a 37 °C, durante a noite. As colónias foram contadas manualmente apenas nas placas que apresentavam entre 30 e 300 colónias. O cálculo das UFC por mililitro foi efetuado com base na equação 2.

Tabela 7: Diluições a semear, para contagem de UFC em placa, pelo método de espalhamento, para cada *checkpoint* (T0-T9).

Checkpoints	Diluições		
T0	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
T2	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
T3	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
T4	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T5	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
T6	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
T7	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
T8	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
T9	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹

Legenda: Entre T0 e T1 decorre 1 hora e entre os restantes *checkpoints* decorrem 30 minutos

Equação 2: Cálculo das Unidades Formadoras de Colónias por mililitro.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\Sigma C}{v \times 1,1 \times d}$$

Legenda: ΣC - Soma das contagens de colónias; d - diluição; v - Volume de diluição

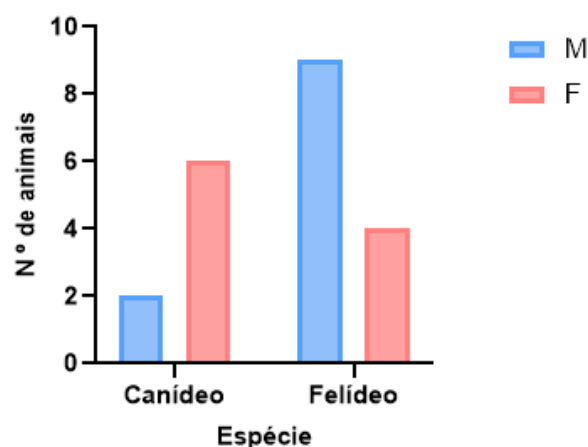
3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Caracterização da população hospitalizada na UICB com infeção bacteriana com suspeita de multirresistência

Dos 72 animais admitidos na UICB com diagnóstico de infeção bacteriana com suspeita de multirresistência, 21 são novos casos (entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020) que não constam no anterior estudo, desenvolvido por Ögren (2020). Assim, a seguinte análise descritiva centra-se nesses novos casos, comparando-os com os resultados obtidos anteriormente.

No anterior estudo, os cães foram a espécie mais afetada (60%), assim como os machos (67%) (Ögren 2020). Quando observamos os novos casos introduzidos (gráfico 3), a maioria dos animais afetados são gatos (62%, n=13), mas os machos continuam a ser os mais afetados (52%, n=11).

Gráfico 3: Distribuição dos novos casos de infecção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21), hospitalizados na UICB, por gênero.



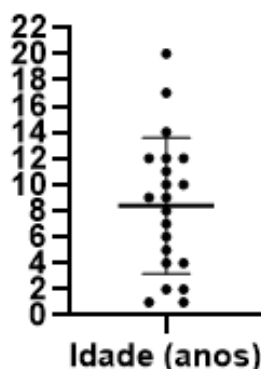
Legenda: M- Macho; F- Fêmea

Com o objetivo de categorizar a idade da população em estudo, esta foi dividida em 5 grupos: jovem (< 1 ano), jovem adulto (≥ 1 e < 3 anos), adulto (≥ 3 e < 7 anos), sênior (≥ 7 e < 10 anos) e geriátrico (≥ 10 anos). Ao observar a tabela 8 e o gráfico 4 é possível concluir que a média de idades dos animais afetados é de 8,4 anos. A faixa etária mais afetada são os animais geriátricos (43%, n=9), e que 62% (n=13) dos animais tem uma idade superior a 7 anos. Estes resultados encontram-se concordantes com o obtido por Ögren (2020), em que 63% da população tinha uma idade superior a 7 anos.

Tabela 8: Categorização (por grupo) das idades dos animais internados na UICB (N=21) com infecção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR.

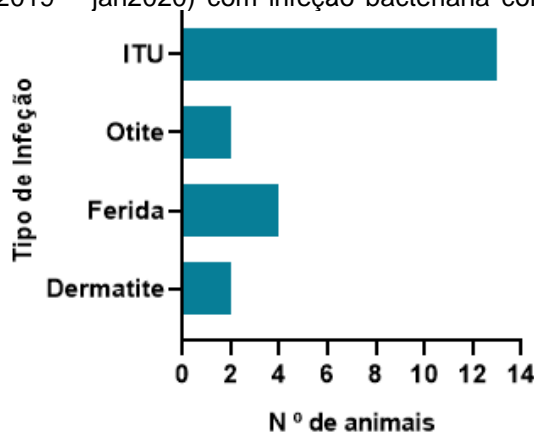
Idade	Grupo Etário	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Jovem adulto	≥ 1 e < 3 anos	4	19%
Adulto	≥ 3 e < 7 anos	4	19%
Sênior	≥ 7 e < 10 anos	4	19%
Geriátrico	≥ 10 anos	9	43%

Gráfico 4: Distribuição das idades dos animais hospitalizados (jan2019 – jan2020) na UICB com infecção bacteriana com critério de MDR (N=21).



No Gráfico 5, estão representados os tipos de infecção que se verificaram de entre os novos casos. 62% dos novos internamentos (n=13) são animais com diagnóstico de infecção do trato urinário. Os restantes tipos de infecção bacteriana que se registaram são dermatites (9,5%, n=2), feridas (19%, n=4) e otites (9,5%, n=2). No estudo de Ögren (2020), as ITU afetavam quase metade da população estudada (42%), sendo seguidas pelas dermatites (22%), o que demonstra uma consistência na hospitalização devido a este tipo de infeções. Verifica-se um aumento das infeções associadas a feridas, tendo em conta que nessa população houve registo de apenas 2 casos e nestes novos casos elas representam 19% dos internamentos.

Gráfico 5: Tipos de infecção na população de animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com infecção bacteriana com critério de MDR.



Legenda: ITU- Infecção do trato urinário

Os agentes etiológicos bacterianos identificados podem ser observados na tabela 9. A bactéria mais vezes isolada foi a *Escherichia coli* (19%, n=4), sempre associada a ITU. A bactéria *Staphylococcus pseudointermedius* foi isolada em 3 casos (14%), relacionados com dermatite, ITU e otite. Verifica-se que, em 29% (n=6) dos casos, as infeções são provocadas por mais do que um agente etiológico, como por exemplo, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Na

população geral estudada por Ögren (2020), a bactéria mais comumente isolada foi a *E. coli* (28%), seguindo-se a *K. pneumoniae* (14%) e a *P. aeruginosa* (14%). Nos novos casos estudados, estas últimas duas bactérias não tiveram qualquer expressão nas infecções dos animais hospitalizados.

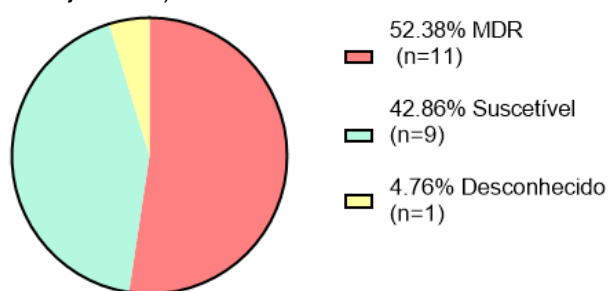
Em relação à resistência ou suscetibilidade dos agentes infecciosos, no gráfico 6 é possível observar que 52% (n=11) são multirresistentes, seguindo a tendência dos valores obtidos no anterior estudo, em que 65% dos agentes etiológicos foram classificados como MDR (Ögren 2020).

Tabela 9: Agentes infecciosos responsáveis pelas infecções bacterianas dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21).

Agentes Infecciosos	Frequência Absoluta	Tipo de Infecção
<i>Citrobacter sp.</i>	1	ITU
<i>Escherichia coli</i>	4	ITU
<i>Morganella morganii</i>	1	Ferida
MRSP	1	Ferida
<i>Proteus mirabilis</i>	1	ITU
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	3	Ferida, ITU, Otite
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	ITU
<i>Staphylococcus cohnii</i> sp. <i>cohnii</i>	1	Dermatite
<i>Staphylococcus sp</i>	1	ITU
Desconhecido	1	ITU
Misto	6	Dermatite, Ferida, ITU, Otite

Legenda ITU- Infecção do Trato Urinário; MRSP- Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius*; Misto- ≥ 2 agentes infecciosos isolados

Gráfico 6: Classificação da resistência dos agentes etiológicos responsáveis pelas infecções bacterianas dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com critério de MDR.



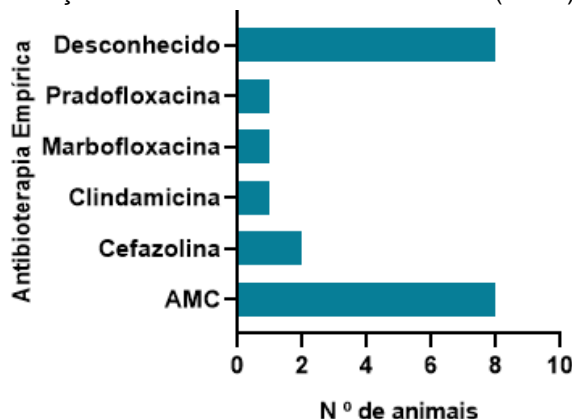
N=21

Legenda: MDR- Multidrug Resistant

Uma terapia antimicrobiana foi instituída, de forma empírica, na maioria das infecções, durante a hospitalização dos animais. No gráfico 7 encontram-se registados os antibióticos utilizados nestes 21 casos. A associação amoxicilina e ácido clavulânico (AMC) foi a mais utilizada, especificamente no tratamento de 8 animais (38%). Estes resultados são

semelhantes aos obtidos no estudo geral da população, em que 29% dos animais foi submetido ao tratamento com AMC (Ögren 2020).

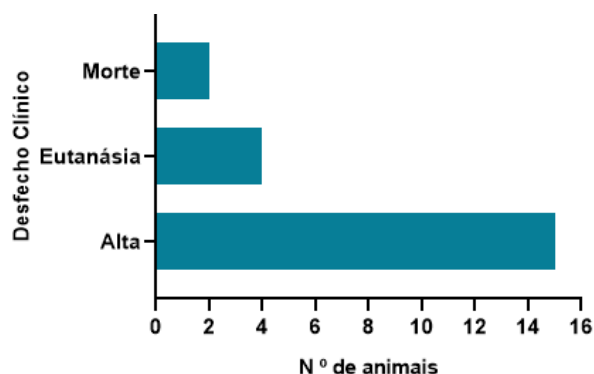
Gráfico 7: Antibioterapia empírica aplicada no tratamento dos animais hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020) com infecção bacteriana com critério de MDR (N=21).



Legenda: AMC- Associação amoxicilina e ácido-clavulâncio

A maioria (71%, n=15) destes 21 animais obteve alta clínica. 29% não sobreviveram, sendo que a eutanásia foi o desfecho de 4 animais (19%) e a morte natural de 2 (10%) (gráfico 8). Estas percentagens vão ao encontro dos resultados obtidos, quando estudada a população geral (Ögren 2020), em que 69% dos animais obteve alta clínica.

Gráfico 8: Desfecho Clínico dos animais hospitalizados na UICB com infecção bacteriana (jan2019 – jan2020) com critério de MDR (N=21).



3.3.2 Caracterização da amostra hospitalizada na UICB com ITU

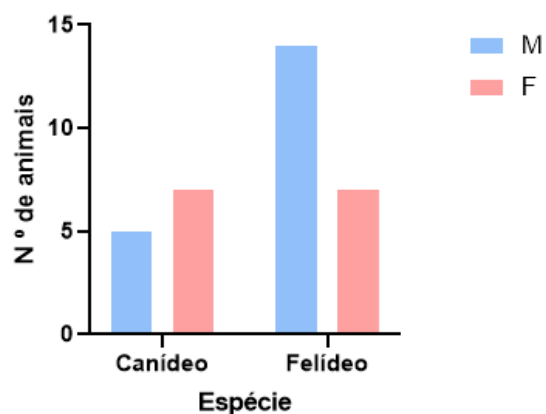
As ITU foram a causa mais frequente de hospitalização na UICB, de entre todas as infecções bacterianas. A amostra é constituída por 33 animais hospitalizados neste local, entre outubro de 2013 e janeiro de 2020, com diagnóstico ou suspeita de ITU. Dessa amostra, 13 são novos casos (jan2019 – jan2020), em relação ao estudo realizado por Ögren (2020).

As infecções bacterianas que afetam o trato urinário ocorrem mais frequentemente na espécie canina do que felina, embora ultimamente tenham sido reportadas frequências mais elevadas em gatos (Gerber et al. 2005; Eggertsdóttir et al. 2007), especialmente quando

existem doenças concomitantes (McGuire et al. 2002). Pensa-se que 14% dos animais da espécie canina desenvolvam a doença ao longo da sua vida, mas que menos de 3% dos gatos sejam afetados (Litster et al. 2011). Contudo, no presente estudo, ocorreram mais casos de ITU em gatos (64%, n=21) do que em cães (37%, n=12), como se pode observar pelo gráfico 9. Quando observamos os 13 novos casos (tabela 10) a tendência mantém-se, tendo em conta que 77% das ITU ocorreram em gatos. Estes resultados, dispares do que seria expectável, podem ser explicados através das percentagens de animais internados devido a ITU como doença primária e concomitante (gráfico 10). 27% dos animais internados na UICB com diagnóstico de ITU foram gatos com a outra doença primária (por exemplo FIV ou FeLV) ou estatuto sanitário desconhecido, sendo a ITU diagnosticada secundariamente.

A maioria dos estudos reporta uma maior percentagem de fêmeas diagnosticadas com ITU, tanto em gatos como em cães (Ling et al. 2001; Cohn et al. 2003; Litster et al. 2011; Thompson et al. 2011). No presente estudo (tabela 10), os felídeos machos (67%, n=14) foram mais afetados do que as fêmeas (33%, n=7). Por outro lado, as percentagens relativas aos canídeos vão ao encontro do que seria esperado, sendo as fêmeas as mais afetadas (58%, n=7). Em relação aos novos casos de ITU (n=13), os machos foram os mais afetados (69%) em ambas as espécies.

Gráfico 9: Distribuição dos casos de ITU, hospitalizados na UICB (out2013 – jan2020), por género e espécie (N=33).



Legenda: M- Macho; F- Fêmea

Gráfico 10: Classificação da origem da ITU, por espécie, nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB (N=33).

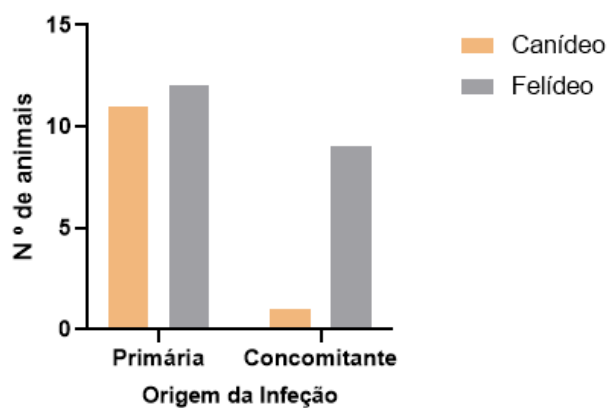


Tabela 10: Género e espécie dos novos casos (N=13) de ITU, hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020).

Espécie \ Género	Género		Total	Total (%)
	M	F		
Canídeo	2	1	3	23%
Felídeo	7	3	10	77%
Total	9	4	13	100%
Total (%)	69%	31%	100%	

Legenda 1: M- Macho; F- Fêmea

A idade é um fator de risco para o aparecimento de ITU. Ocorre mais frequentemente em animais mais velhos, aproximadamente entre os 7 e 8 anos nos cães e em gatos com idade superior a 10 anos (Ling et al. 2001; Cohen et al. 2008; Litster et al. 2011; Franco 2017). Diversos estudos concluíram que as ITU são mais comuns em fêmeas, da espécie canina e de idade avançada (Thomsen et al. 1986; Ling et al. 2001; Cohen et al. 2008). Ao estudar a população alvo, os resultados obtidos mostraram-se consistentes com o que se encontra na literatura. Na tabela 11, quando observamos os novos casos, 54% (n=7) dos animais com ITU pertencem aos escalões 'Sénior' e 'Geriátrico'. Estes valores encontram-se em conformidade com os resultados obtidos na análise da totalidade dos casos, em que 67% (n=22) dos animais tem uma idade igual ou superior a 7 anos e os animais geriátricos (≥ 10 anos) representam mais de 50% (n=17) da amostra populacional.

Tabela 11: Categorização (por grupo) das idades dos animais internados (Total de casos - 33; Novos casos - 13) na UICB com ITU (jan2019 – jan2020).

Idade	Grupo Etário	Total de Casos ITU (n=33)		Novos casos (n=13)	
		Frequência Absoluta	Frequência Relativa	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Jovem	< 1 ano	1	3%		
Jovem adulto	≥ 1 e < 3 anos	2	6%	2	15%
Adulto	≥ 3 e < 7 anos	8	24%	4	31%
Sénior	≥ 7 e < 10 anos	5	15%	1	8%
Geriátrico	≥ 10 anos	17	52%	6	46%

Legenda: ITU- Infecção do trato urinário

Em relação ao agente etiológico responsável pelas ITU, a *E. coli* é a bactéria mais comumente isolada, tanto em gatos como em cães. De seguida, as bactérias mais frequentemente isoladas são as espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*, no caso dos gatos, e *Staphylococcus spp.* e *Proteus spp.*, no caso dos cães (Ling et al. 2001; Litster et al. 2007; Cohen et al. 2008; Marques et al. 2016; Franco 2017; Teichmann-Knorrn et al. 2018). Os resultados obtidos neste estudo (gráfico 11 e tabela 12) revelam, tanto na totalidade dos casos como nos novos casos adicionados, o agente etiológico mais vezes isolado foi a bactéria *E. coli* (42%; n=14 e 31%; n=4, respetivamente). Na totalidade dos casos, os agentes infecciosos que se seguem são a *K. pneumoniae* (12%, n=4) e a *P. aeruginosa* (9%, n=3). Apesar de estas últimas bactérias não constarem, normalmente, dos agentes etiológicos mais frequentemente isolados, num estudo efetuado por Ling et al. (2001), estas bactérias encontravam-se nas dez mais isoladas numa população de 8345 animais (763 estirpes de *K. pneumoniae* e 249 estirpes de *P. aeruginosa*). Seguin et al. (2003) concluiu que as seis bactérias mais prevalentes em casos de ITU recorrente ou permanente, em cães, são *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus spp.* e *Pseudomonas spp.*.

Estes dados permitem justificar a presença destas bactérias na população alvo do presente estudo.

Dos agentes etiológicos, 67% (n=22) eram bactérias multirresistentes (MDR) (gráfico 12). Estes resultados não se revelam surpreendentes, tendo em conta que o isolamento de bactérias resistentes, em animais de companhia com ITU, tem vindo a aumentar, revelando-se uma das maiores preocupações para os clínicos (Normand et al. 2000; Thompson et al. 2011; WHO 2015; Marques et al. 2016). Ao longo de 16 anos, Marques et al. (2018) desenvolveram uma investigação que demonstrou o aumento significativo, ao longo do tempo, da resistência da maioria das bactérias causadoras de ITU em gatos e cães aos antibióticos utilizados no seu tratamento. A nível europeu, as estirpes de *E. coli* originários de Portugal, Espanha e Itália, e as estirpes de *Proteus spp.* de Portugal apresentaram a mais elevada frequência de MDR, numa investigação realizada num conjunto de 14 países europeus (Marques et al. 2016).

Gráfico 11: Agentes bacterianos causadores de ITU nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB (N=33).

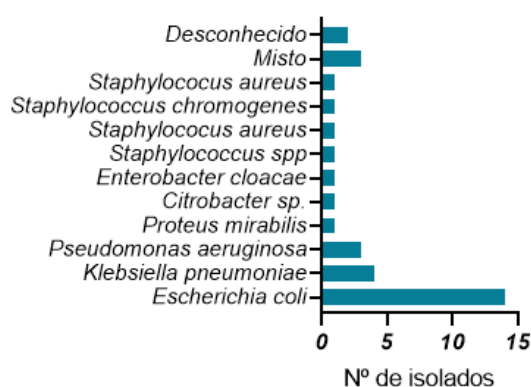
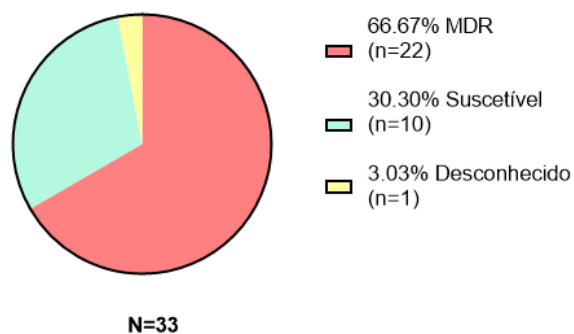


Gráfico 12: Classificação da resistência dos agentes etiológicos isolados causadores de ITU nos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB.



Legenda: MDR- Multidrug Resistant

Tabela 12: Agentes infecciosos causadores de ITU nos novos casos (N=13) hospitalizados na UICB (jan2019 – jan2020).

Novos casos (n=13)	Frequência Absoluta
Agentes Infecciosos	
<i>Citrobacter sp.</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1
<i>Staphylococcus sp</i>	1
Desconhecido	1
Misto	3

Legenda: Misto- ≥ 2 agentes infecciosos isolados

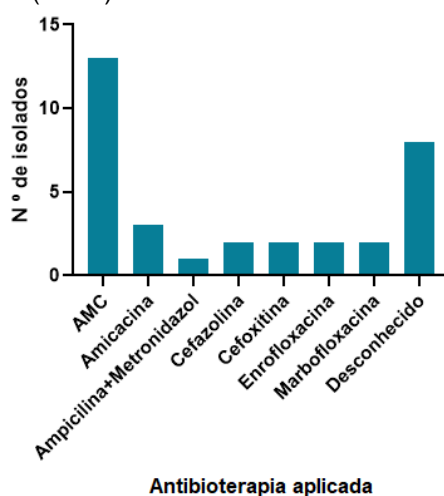
A antibioterapia foi iniciada antes dos resultados do teste de suscetibilidade aos antibióticos, de forma empírica, sendo que, posteriormente, o tratamento foi ajustado tendo em conta esses resultados.

A associação AMC foi utilizada em 39% (n=13) das infeções, sendo o antibiótico a que mais vezes se recorreu (gráfico 13). A sua utilização, pela maior parte dos clínicos numa abordagem inicial, é expectável tendo em conta que é considerado uma boa opção de primeira linha (Silva 2019; Weese et al. 2019). Como o agente causal da maioria dos animais internados com ITU na UICB é multirresistente, foi necessário recorrer a antibióticos de segunda linha, como o caso da amicacina (9%), marbofloxacina (6%) e enrofloxacina (6%). Weese et al. (2019) considera que o uso destes antibióticos deve ser reservado ao tratamento de infeções persistentes e/ou recorrentes, o que pode ser a situação de alguns destes animais hospitalizados.

Ao observar o gráfico 13 pode concluir-se que, no tratamento de ITU são utilizados, maioritariamente, três classes de antibióticos: β -lactâmicos (54%), fluoroquinolonas (12%) e aminoglicosídeos (9%). Infelizmente, não foi possível aferir a antibioterapia empírica aplicada a 24% (n=8) dos animais. Esse desconhecimento de informação está relacionado com informação inacessível ou situações em que os animais foram internados num momento posterior à realização de um TSA.

Relativamente ao ajustamento do tratamento, na tabela 13 é possível observar que, com base nos resultados do TSA, 21% dos animais necessitou de um ajustamento da antibioterapia inicialmente aplicada. Em 27% dos casos o antibiótico escolhido encontrava-se corretamente aplicado e, infelizmente, em mais de metade das situações (52%, n=17) a informação não se encontrava disponível para ser avaliada

Gráfico 13: Antibioterapia empírica instituída aos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB com ITU (N=33).



Legenda: AMC - Associação amoxicilina e ácido clavulânico

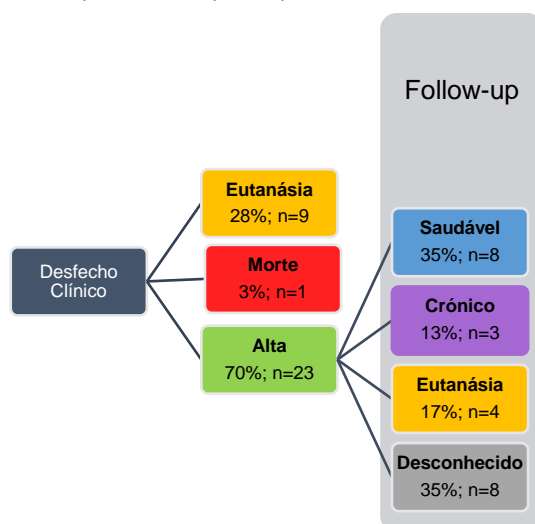
Tabela 13: Alterações, após o TSA, à antibioterapia instituída aos animais hospitalizados (out2013 – jan2020) na UICB com ITU (N=33).

Decisão após TSA	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Manteve	9	27%
Alterou	7	21%
Desconhecido	17	52%

Legenda: TSA- Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos

Em relação ao desfecho clínico (gráfico 14), dos animais hospitalizados na UICB com diagnóstico de ITU, apenas um animal morreu devido à infeção e 28% (n=9) foram submetidos a eutanásia. Dos animais que obtiveram alta clínica (70%, n=23), 35% (n=8) recuperaram totalmente demonstrando-se saudáveis nas consultas de seguimento, 13% (n=3) são pacientes crónicos, ou seja, a infeção é recorrente ou persistente e 17% (n=4) foram submetidos a eutanásia.

Gráfico 14: Desfecho clínico e *follow-up* dos animais internados na UICB (out2013 – jan2020) com ITU (N=33).



3.3.3 Avaliação das Curvas de Crescimento

Analisando a curva de crescimento de uma cultura bacteriana, podemos estudar qual o desenvolvimento dessa população (Willey et al. 2008). É necessário executar esta tarefa antes de iniciar o estudo propriamente dito, uma vez que a maioria das estirpes resultaram de culturas antigas, que se encontravam refrigeradas há um período considerável. Através dos resultados das curvas de crescimento é possível ajustar as condições ambientais e os meios de cultura, de forma a otimizar o crescimento celular. No trabalho experimental sobre o mesmo tema, desenvolvido por Ögren (2020), todos estes aspetos foram testados e aperfeiçoados. Assim, apenas foram desenvolvidas curvas de crescimento para as duas novas estirpes de

E. coli, uma estirpe de *K. pneumoniae*, para além da estirpe de *E. coli* ATCC, de forma a comprar as suas exigências metabólicas.

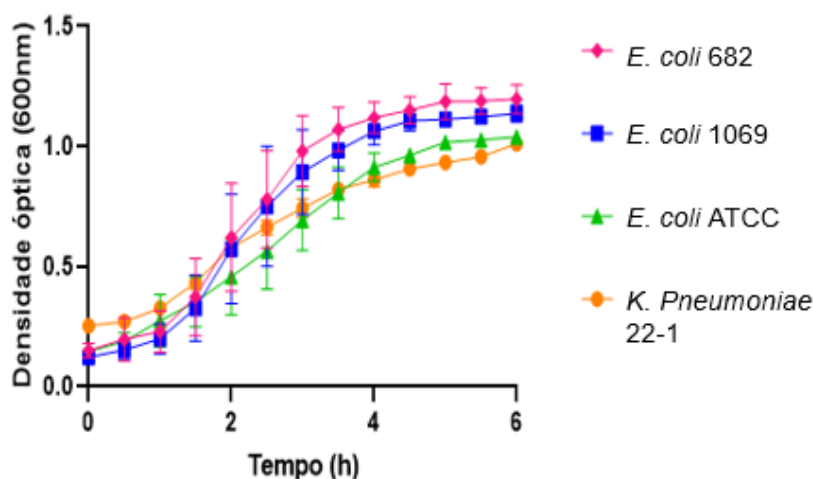
Neste caso, as bactérias foram mantidas num meio líquido que funcionou como um sistema fechado, ou seja, as bactérias foram incubadas num tubo de ensaio com uma quantidade única de meio de cultura. Assim, neste sistema, as concentrações de nutrientes diminuem ao longo do tempo e, contrariamente, os produtos tóxicos aumentam (Willey et al. 2008).

Como as bactérias são microrganismos que se reproduzem por divisão binária, a sua curva de crescimento pode ser representada graficamente, relacionando o aumento de bactérias viáveis em função do tempo, tendo quatro fases distintas: a fase *lag*, em que crescimento celular é aproximadamente zero; a fase exponencial, onde o crescimento e divisão celular ocorre a um ritmo máximo e de forma constante; a fase estacionária, em que o crescimento celular diminui, ou até, cessa; e, por fim, a fase de morte, representada por uma diminuição do número de células viáveis (Willey et al. 2008; Quinn et al. 2011b).

Seguindo o protocolo adaptado por Ögren (2020), para as estirpes de *E. coli* o meio de cultura utilizado foi LB. Nesse protocolo, o meio LB limitou o crescimento das estirpes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, tendo sido alterado para o meio de cultura TSB e, portanto, essa foi a escolha para essas estirpes no presente estudo.

Observando o gráfico 15, é possível concluir que a curva de crescimento de cada uma das estirpes se encontra de acordo com o esperado. Todas atingiram a fase de crescimento exponencial, indicando que, apesar de as amostras se encontrarem refrigeradas, é possível obter novas culturas. Comparando as curvas de crescimento das estirpes MDR (682 e 1069) com a *E. coli* ATCC, concluímos que as exigências de nutrientes não foram superiores para as estirpes multirresistentes. Se tal se tivesse verificado, as curvas de crescimento teriam abrandado ou terminado o crescimento mais cedo (Willey et al. 2008).

Gráfico 15: Curvas de crescimento das estirpes selecionadas, desenvolvidas ao longo de 6 horas, com medição dos valores da DO (600 nm) a cada hora.



3.3.4 Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos: método de microdiluição em placa

No presente estudo foi desenvolvida uma nova formulação lipossomal com o objetivo de melhorar as CMI, tendo em conta que no anterior estudo tal não foi possível alcançar (Ögren 2020). A formulação fusogénica utilizada, composta por PC, DOPE e CHEMS, com um rácio molar 4:4:2, respetivamente, obteve uma eficácia de encapsulação de 6%. Quando comparada com a formulação utilizada no anterior estudo, a eficácia de encapsulação revelou-se menor do que a obtida por Ögren (2020), mas a composição lipídica e os rácios molares são diferentes, logo não devem ser comparados.

A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração, pertencente ao grupo dos β -lactâmicos. As cefalosporinas de terceira geração são indicadas para o tratamento de infeções urinárias causadas por bactérias multirresistentes ou casos de infeções recorrentes e/ou persistentes, devido ao seu largo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e à estabilidade que apresentam contras as β -lactamases (Prescott 2013; Weese et al. 2019).

Este antibiótico é utilizado, frequentemente, no tratamento de infeções urinárias complicadas e simples na medicina humana (Lin et al. 2016). Como consequência, o seu uso é raro na medicina veterinária. Contudo, já mostrou resultados em infeções urinárias em animais de companhia (Colakoglu et al. 2017; Punia et al. 2018). Numa amostra de 22 cães diagnosticados com ITU, Punia et al. (2018) concluíram que, de entre os agentes isolados, a ceftriaxona, associada ou não ao tazobactam, foi o antibiótico que atingiu o máximo de eficácia, *in vitro*.

Neste estudo pretende-se comprar a eficácia, *in vitro*, do antibiótico ceftriaxona (CTX), nas formulações livre e encapsulada, através da determinação das CMI das estirpes clínicas de animais de companhia diagnosticados com ITU.

I. Utilização do AlamarBlue®

A utilização do AlamarBlue® (resazurina) é necessária devido à turvação das preparações lipossomais, o que não permite avaliar, com precisão, a existência ou ausência de crescimento bacteriano. Este reagente de viabilidade celular altera a sua cor, de azul para rosa, quando existe proliferação das células bacterianas. De forma a estabelecer uma correlação entre a viabilidade celular e a redução do reagente, foi desenvolvido um ensaio onde se compara a curva de crescimento, o valor de viabilidade celular e a contagem de células.

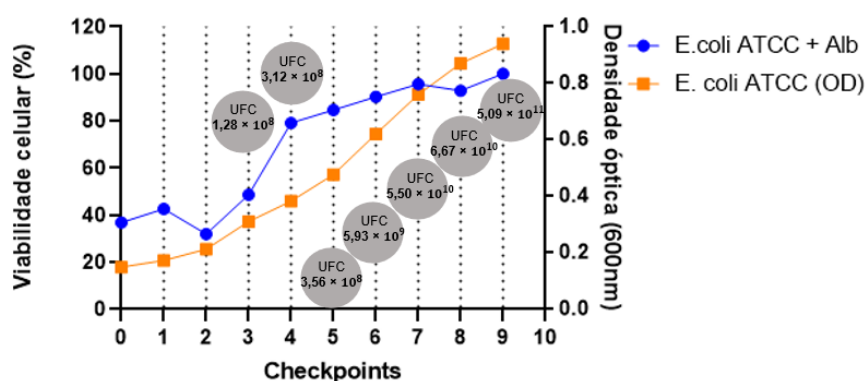
Os valores relativos à viabilidade celular (gráfico 16 - azul) foram obtidos através da resolução da equação 1, descrita nos materiais e métodos, em que T9 corresponde ao crescimento celular máximo (100%). A curva de crescimento (gráfico 16 - laranja) foi obtida, através da medição da DO ao longo dos mesmos *checkpoints*. Ambas as curvas devem

mostrar-se semelhantes, apresentando as fases típicas de uma curva de crescimento celular, tendo em conta que traduzem a evolução de uma população de células ao longo do tempo, num meio de cultura limitado ao nível de nutrientes (Quinn et al. 2011b).

No gráfico 16, encontram-se duas curvas, uma correspondente à curva de crescimento determinada através da medição da DO (laranja) e a outra à viabilidade das células ao longo do tempo (azul). As curvas são semelhantes, apresentando uma fase *lag* (T0-T2), exponencial (T2-T7) e estacionária (T7-T9). A contagem de UFC/mL (gráfico 16 – círculos cinzentos) também se encontra concordante com as curvas apresentadas, tendo em conta que existe um aumento do número de colónias ao longo do tempo.

Conclui-se que, existe uma concordância entre os dois métodos avaliados. Assim, podemos validar a utilização deste reagente como indicador de viabilidade celular.

Gráfico 16: Comparação entre a os valores da densidade óptica a 600 nm (tracejado laranja), quantificação da viabilidade celular com recurso ao AlamarBlue (Tratado Vs. Controlo - %; tracejado azul) e UFC/mL (círculos cinzentos) ao longo dos 9 *checkpoints* estabelecidos.

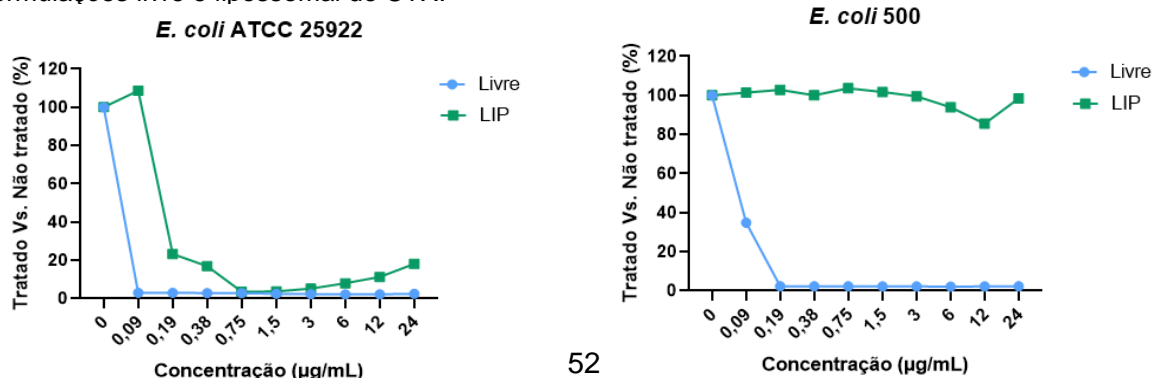


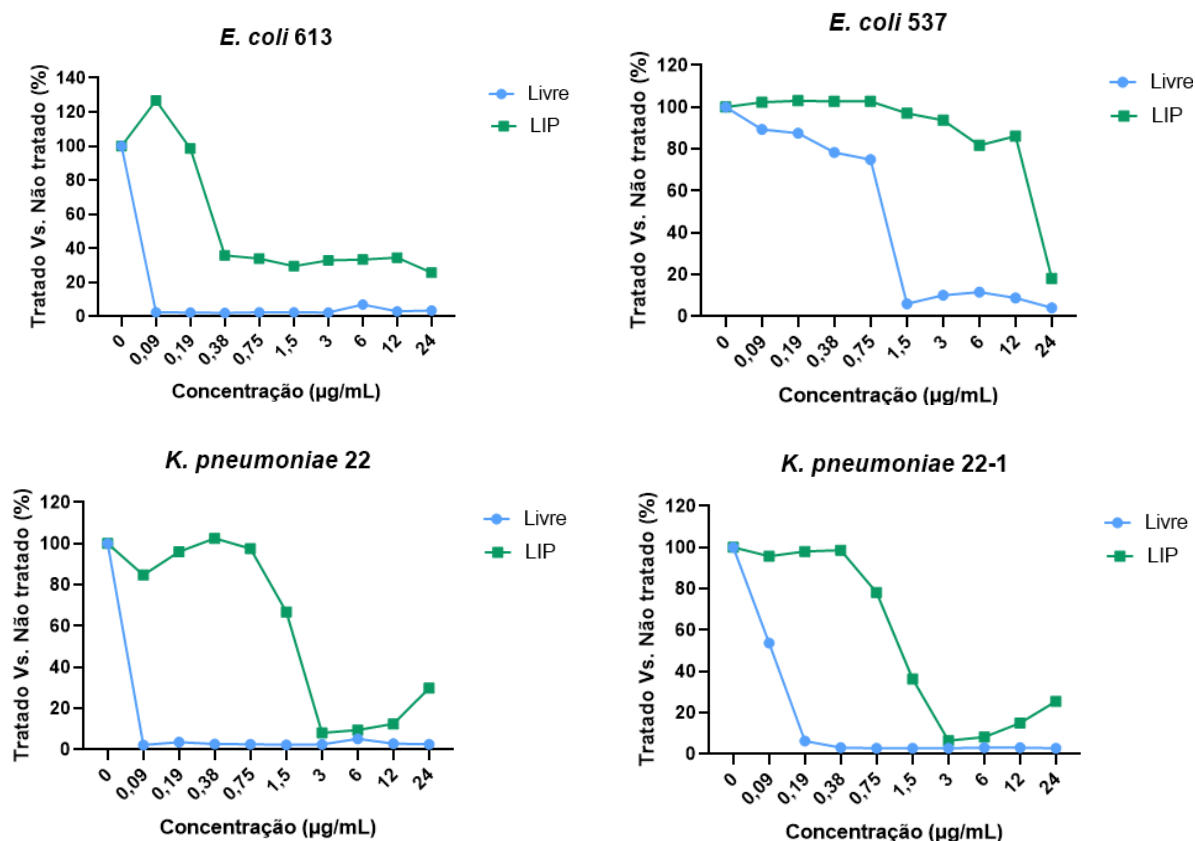
Legenda: UFC- Unidade formadoras de colónias; Alb- AlamarBlue; OD- Densidade óptica
Entre T0 e T1 decorre 1 hora e entre os restantes *checkpoints* decorrem 30 minutos.

II. Atividade antimicrobiana da CTX, in vitro, contra as estirpes suscetíveis

Cada estirpe clínica classificada como suscetível foi testada nas formulações livre e lipossomal de CTX, na concentração inicial de 24 µg/mL e nas oito concentrações seriadas, todas efetuadas em triplicado. Nos gráficos 17 podem ser observados os resultados da atividade antimicrobiana da CTX, em ambas as formulações, e na tabela 14 os valores das CMI para cada estirpe.

Gráfico 17: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes suscetíveis testadas, quando submetidos às diferentes concentrações (seriadas 1:2 - 24 µg/mL a 0,09 µg/mL) das formulações livre e lipossomal de CTX.





Legenda: Eixo y- Viabilidade Celular (%); Eixo x- Concentrações das formulações lipossomal e livre testadas

Tabela 14: Valores da CMI, obtidos através da viabilidade celular, correspondentes a cada formulação (livre e lipossomal) para cada estirpe clínica suscetível testada.

Estirpes Suscetíveis	Concentração Mínima Inibitória (µg/mL)		
	Presente Estudo		Ögren 2020
	CTX Livre	CTX Lipossomal Fusogénica	CTX Lipossomal
<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤ 0,09375	0,75	1,5
<i>E. coli</i> 500	0,1875	> 24	1,5
<i>E. coli</i> 537	1,5	24	0,75
<i>E. coli</i> 613	≤ 0,09375	0,375	3
<i>K. pneumoniae</i> 22	≤ 0,09375	3	3
<i>K. pneumoniae</i> 22-1	0,1875	3	3

Legenda: CTX- Ceftriaxona; Ögren 2020- Anterior estudo com outra formulação

Em relação à *E. coli* ATCC, segundo os parâmetros de controlo de qualidade do CLSI (2020) e do EUCAST (2015), os valores da CMI (tabela 14) da formulação livre encontram-se dentro dos valores aceitáveis para a ceftriaxona (referência: 0,03-0,12 µg/mL), enquanto que o valor da formulação lipossomal se encontra acima do valor máximo aceitável.

Os dados representados na tabela 14 e nos gráficos 17 demonstram que, em todas as estirpes testadas, a CMI da formulação lipossomal foi superior à da formulação livre, ou seja, a atividade antibacteriana da CTX encapsulada foi 4 a 16 vezes inferior à forma livre,

excetuando para a estirpe *K. pneumoniae* 22, que se verificou ser 32 vezes inferior. Em relação à estirpe 500, a formulação lipossomal não demonstrou qualquer eficácia, contrariando os resultados obtidos com a formulação utilizada no estudo de Ögren (2020). Para além disso, as CMI da CTX livre de todas as estirpes encontram-se dentro dos limites da suscetibilidade aceites pelo CLSI (2020), enquanto que, em relação à formulação lipossomal, apenas as CMI da estirpe *E. coli* 613 se encontra dentro desses limites estabelecidos. Em comparação com o estudo sobre o mesmo tema, realizado por Ögren (2020), que testou estas mesmas estirpes, mas com uma formulação lipossomal diferente, o resultado foi ligeiramente melhor na estirpe *E. coli* 613, em que foi possível atingir uma CMI inferior, e pior na estirpe *E. coli* 537, em que a formulação lipossomal só demonstrou efeito na concentração mais elevada.

Tanto os resultados obtido no presente estudo como aqueles publicados por Ögren (2020), vão em sentido contrário aos resultados publicados por vários autores em diversos estudos, em que a formulação lipossomal utilizada reduziu os valores da CMI em comparação com a formulação livre, quando testadas contra algumas das bactérias mais comuns (Drulis-Kawa et al. 2006; Gubernator et al. 2008; Drulis-Kawa et al. 2009). Um exemplo é o estudo realizado por Ebrahimi et al. (2020), em que a ceftriaxona encapsulada em nanopartículas lipídicas (semelhante a lipossoma) demonstrou, contra *E. coli*, uma atividade antimicrobiana superior do que o antibiótico na formulação livre. Além disso, sugere que, se a dose de antibiótico encapsulado for reduzida para metade, a mesma eficácia será alcançada.

Quando se desenvolvem lipossomas, o principal objetivo é obter uma eficácia de encapsulação satisfatória, tendo em conta que as formulações lipossomais apenas são úteis quando existe uma quantidade terapêutica do fármaco encapsulado e uma quantidade de lípido que seja proporcional (Sharma A and Sharma U 1997). Os métodos de preparação de lipossomas são complexos e envolvem diferentes procedimentos, o que aumenta a probabilidade de erro ao longo de todo o processo (Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010). Um aspeto também importante é a esterilização, que ocorre no fim de todo o processo. Como os lipossomas são muito sensíveis a altas temperaturas e sofrem facilmente oxidação e hidrólise, não podem ser sujeitos ao calor, radiação ou agentes químicos (Zuidam et al. 1993), assim, recorre-se à filtração mecânica, estando sujeita a erros do operador (Sharma A and Sharma U 1997).

É necessário salientar que, a interação entre as vesículas lipídicas e as células bacterianas não depende apenas da formulação lipossomal, mas também das características da superfície bacteriana (Drulis-Kawa et al. 2009). As propriedades da membrana bacteriana, como pH, temperatura e carga à superfície são fatores que podem interferir no processo de fusão entre lipossoma e bactéria (Alipour et al. 2008). Por exemplo, as elevadas quantidades de fosfatidiletanolamina que algumas bactérias Gram-negativas possuem podem ser favoráveis à fusão com lipossomas fluídos (Ma et al. 2013). No entanto, a composição lipídica

e a carga superficial do lipossoma desempenham um papel determinante na interação entre lipossoma e bactéria, e no comportamento da formulação lipídica quando testada *in vivo*, sendo a fluidez ou rigidez dos lipossomas o fator mais importante no controlo do mecanismo de fusão (Ma et al. 2013).

Embora no anterior estudo, realizado por Ögren (2020), tenha sido dada prioridade ao desenvolvimento de lipossomas com elevada eficácia de encapsulação, neste estudo o objetivo seria avaliar se uma formulação fusogénica teria uma eficácia superior nas mesmas estirpes. Para tal, foi desenvolvida uma formulação fusogénica (PC: DOPE: CHEMS; 4:2:2) com o objetivo de aumentar a interação entre o antibiótico encapsulado e a bactéria alvo, favorecendo a libertação do conteúdo das vesículas no interior das células. Isto porque a capacidade de atingir uma sub-CMI não está relacionada com a rápida libertação do fármaco a partir das formulações lipossomais, mas sim, com a interação ou fusão electrostática entre os lipossomas e bactéria (Drulis-Kawa et al. 2006). A presença do lípido DOPE leva ao aumento da lipofilicidade da membrana lipossomal e reduz a interação existente entre as bicamadas lipídicas do próprio lipossoma (Nicolosi et al. 2010; Ma et al. 2013). Um estudo realizado por Ma et al. (2013) confirma o potencial de fusão dos lipossomas que continham o lípido fusogénico DOPE, contra a bactéria *P. aeruginosa*, tendo em conta que a capacidade de fusão da formulação lipossomal utilizada aumentou de 20% para 56%, conforme a quantidade de DOPE utilizado. Neste mesmo estudo, também foi possível comprovar que a adição de iões cálcio (catiónicos) às formulações permitiu melhorar as propriedades fusogénicas, especialmente se a formulação for aniónica. Nicolosi et al. (2010) exploraram as propriedades fusogénicas das vesículas unilamelares DOPE:DPPC:CHEMS com o objetivo de libertar o antibiótico, não dentro das células, mas especificamente no espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas. Quando a vancomicina foi encapsulada nestes lipossomas, a atividade antimicrobiana foi exercida.

No que refere à carga à superfície dos lipossomas, quando são neutros, não interagem significativamente com as células, levando a que o fármaco encapsulado entre nas células após ser libertado no espaço extracelular. No caso de a carga ser positiva, existe uma interação mais proeminente entre membranas, enquanto que, os lipossomas carregados negativamente são predominantemente absorvidos por meio de endocitose (Sharma A and Sharma U 1997). As vesículas lipídicas catiónicas exibem, geralmente, melhores taxas de associação e internalização, devido à membrana plasmática das bactérias Gram-negativas ser carregada negativamente ou, no caso das bactérias Gram-positivas devido à presença de peptidoglicano, o que permite uma atração eletrostática entre ambos (Drulis-Kawa et al. 2006; Hillaireau and Couvreur 2009). Um exemplo são os resultados obtidos no estudo de Drulis-Kawa et al. (2006), onde o antibiótico meropenem foi encapsulado em vesículas aniónicas, neutras e catiónicas de modo a comparar a eficácia de cada um. As atividades bacterianas

mais eficazes foram demonstradas pelas formulações catiónicas PC:DOPE:DOTAP (3:4:3) e PC:Chol:DOTAP (3:4:3), em que os valores de CMI foram 2 a 4 vezes menores quando comparado com o antibiótico livre. No entanto, é de salientar que, uma formulação lipídica carregada negativamente já obteve resultados positivos, ao erradicar a bactéria *P. aeruginosa*, quando testada num modelo animal, para a infecção pulmonar crónica (Beaulac et al. 1996).

No trabalho desenvolvido anteriormente sobre este tema (Ögren 2020), foi utilizada uma formulação lipossomal aniónica (carregada negativamente) PC:PG (8:2), tendo em conta que as formulações carregadas negativamente estão associadas a uma melhor estabilidade física e a uma maior eficácia de encapsulação (Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010; Gao et al. 2018). Pensa-se que, apesar de ter sido alcançada uma elevada eficácia de encapsulação, a formulação lipossomal tenha demonstrado resultados menos satisfatórios devido à possível repulsão eletrostática que ocorre entre a carga negativa das bactérias testadas e a formulação utilizada (Drulis-Kawa et al. 2006; Ögren 2020). Ainda que, no presente estudo, a formulação utilizada seja, igualmente, aniónica e esteja sujeita à ocorrência de repulsão entre lipossoma e bactéria, pretende-se que esse problema fosse ultrapassado através da capacidade de fusão inerente à utilização do lípido DOPE. Apesar de todas as vantagens já apresentadas em relação à utilização deste lípido na formulação de lipossomas, existe uma desvantagem que se prende com uma menor eficácia de encapsulação, especialmente quando os lipossomas são aniónicos, que pode ser de apenas 2 a 3%, comparando com a utilização de outros lípidos (Lutwyche et al. 1998; Moyá et al. 2019). A eficácia de encapsulação obtida no presente estudo foi de 6%, o que vai ao encontro das percentagens mais baixas observadas nos estudos supracitados.

Os resultados obtidos no presente estudo (tabela 14) revelam que o antibiótico encapsulado não aumentou a sua atividade antibacteriana, *in vitro*, em comparação com a sua forma livre, embora a formulação encapsulada tenha mostrado resultados de inibição do crescimento bacteriano. Tendo em conta estes resultados, provavelmente as propriedades fusogénicas da formulação utilizada não foram suficientes para ultrapassar a repulsão eletrostática que existe entre as bactérias e os lipossomas com carga negativa à superfície. Para além disso, seria necessário alcançar uma percentagem de eficácia de encapsulação mais elevada para se atingir os objetivos propostos.

Apesar dos resultados obtidos nos estudos *in vitro*, quando as formulações lipossomais são testados em modelos *in vivo*, os resultados podem alterar-se. Os lipossomas catiónicos aparentam ter melhores resultados *in vitro*, mas a sua maior problemática pode ocorrer *in vivo*, devido à possível interação com as proteínas plasmáticas (carregadas negativamente), o que pode levar à formação de agregados. Além do mais, podem ter uma maior tendência para efeitos adversos devido a uma taxa de captação celular não específica

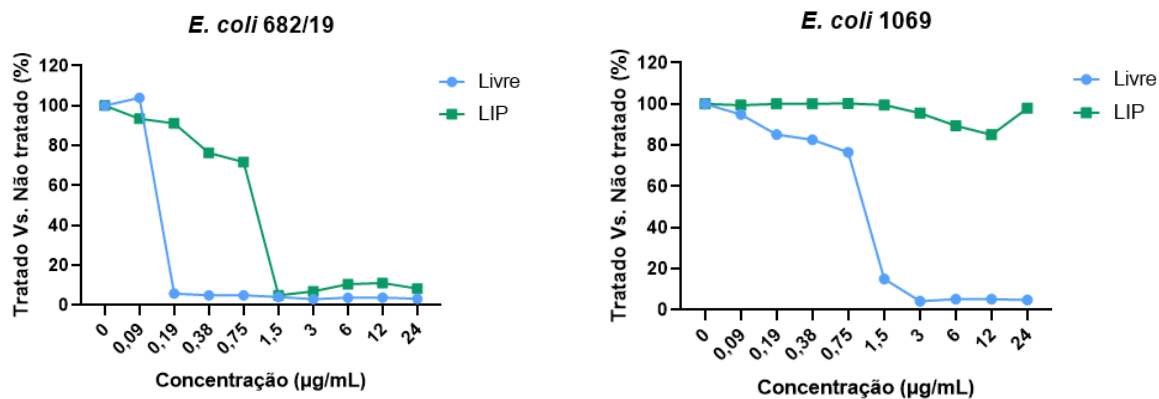
mais elevada (Hillaireau and Couvreur 2009; Kraft et al. 2014). Por outro lado, os lipossomas aniônicos apresentam uma vantagem quando utilizados *in vivo*, pois o problema da agregação não se coloca, logo são mais estáveis, podendo chegar ao local alvo de ação sem que ocorra a libertação prematura do fármaco encapsulado. Outra vantagem, *in vivo*, pode estar relacionada com a presença de antígeno bacteriano no local de infeção, o que leva à formação de uma resposta inflamatória favorável à libertação do fármaco encapsulado, ultrapassando-se, assim, o problema da repulsão electrostática (Sachetelli et al. 2000; Drulis-Kawa et al. 2006; Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010).

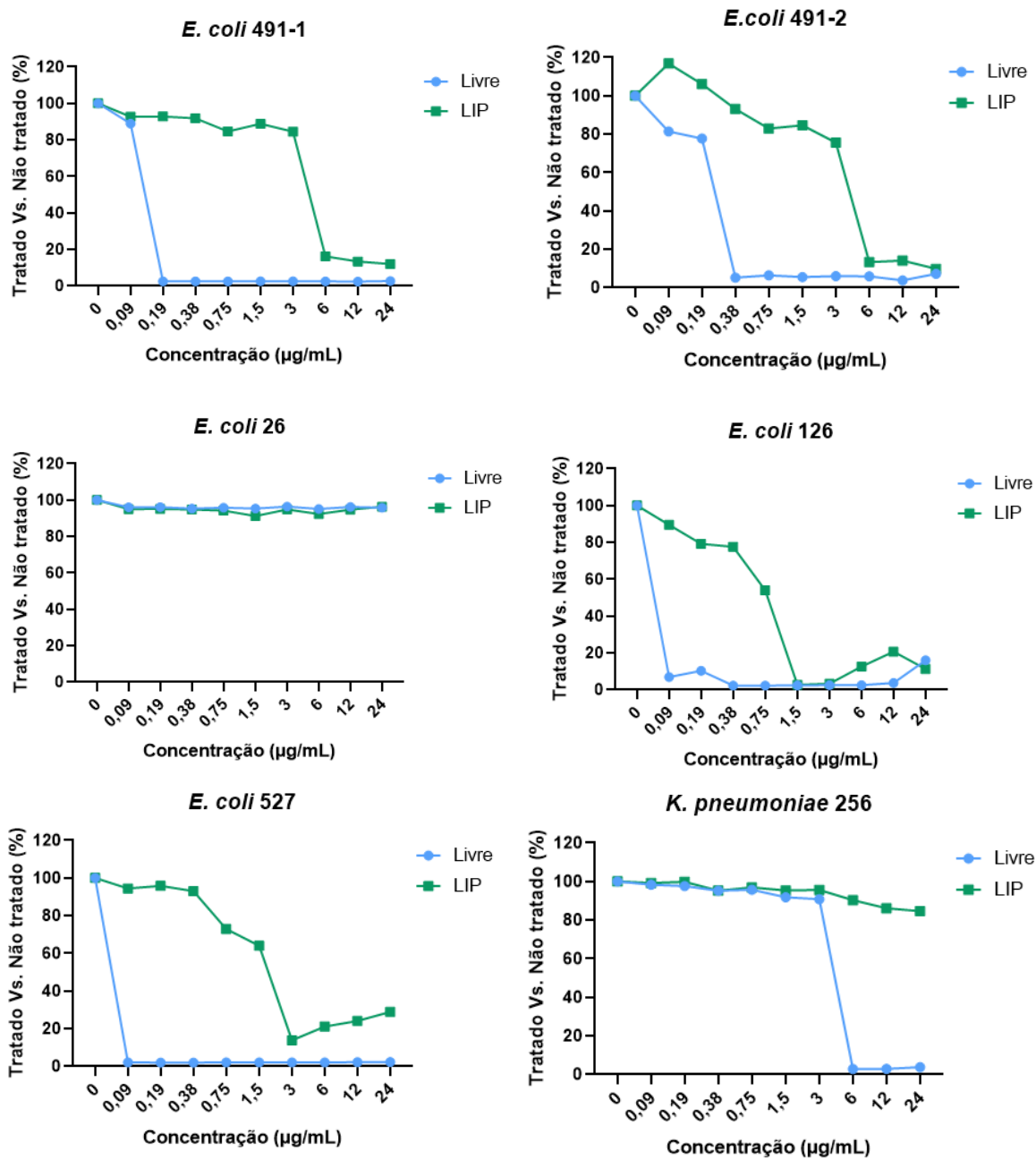
Concluindo, apesar de a atividade antimicrobiana da formulação lipossomal não ter superado ou igualado a CTX livre, foi atingido um valor de CMI mais baixo para uma das estirpes, em comparação com os resultados obtidos com a formulação utilizada no estudo anterior, realizado por Ögren (2020). Estes resultados são indicativos de que esta nova formulação é promissora, mas são necessários outros trabalhos no sentido de aperfeiçoar a estabilidade da formulação fusogénica utilizada e melhorar a eficácia de encapsulação, de forma a que o rácio antibiótico/lípido presente no lipossoma seja melhorado. De realçar que estes resultados podem ser alterados quando postos em prática em modelos *in vivo*, tendo em conta que a interação com os vários sistemas e mecanismos do organismo não está contemplada neste estudo.

III. Atividade antimicrobiana da CTX, *in vitro*, contra as estirpes MDR

Igualmente ao que sucedeu com as estirpes suscetíveis, as estirpes classificadas como MDR também foram testadas nas formulações livre e lipossomal de CTX, na concentração inicial de 24 µg/mL e nas oito concentrações seriadas, todas efetuadas em triplicado. Nos gráficos 18 podem ser observados os resultados da atividade antimicrobiana da CTX em ambas as formulações e na tabela 15 os valores das CMI para cada estirpe.

Gráfico 18: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes MDR testadas, quando submetidos às diferentes concentrações (seriadas 1:2 - 24 µg/mL a 0,09 µg/mL) das formulações livre e lipossomal de CTX.





Legenda: Eixo y- Viabilidade Celular (%); Eixo x- Concentrações das formulações lipossomal e livre testadas

Tabela 15: Valores da CMI, obtidos através da viabilidade celular, correspondentes a cada formulação (livre e lipossomal) para cada estirpe clínica MDR testada.

Estirpes MDR	Concentração mínima inibitória (µg/mL)		
	Presente Estudo		Ögren 2020
	CTX Livre	CTX Lipossomal Fusogénica	CTX Lipossomal
<i>E. coli</i> 26	> 24	> 24	> 120
<i>E. coli</i> 126	≤ 0,09375	1,5	1,5
<i>E. coli</i> 527	≤ 0,09375	3	1,5
<i>E. coli</i> 491-1	0,1875	6	3
<i>E. coli</i> 491-2	0,375	6	3
<i>K. pneumoniae</i> 256	6	> 24	> 120
<i>E. coli</i> 682	0,1875	1,5	
<i>E. coli</i> 1069	1,5	> 24	

Legenda: CTX- Ceftriaxona; MDR- Multi-drug Resistant; Ögren 2020- Anterior estudo com outra formulação

Ao observar os resultados que se encontram na tabela 15, e à semelhança do que ocorreu com as estirpes suscetíveis, a formulação lipossomal apresentou valores de CMI superiores aos da formulação livre, revelando que a sua atividade antimicrobiana é inferior entre 8 e 32 vezes, quando comparada com a CTX livre. Por outro lado, e contrariamente ao que ocorreu com as estirpes suscetíveis, em algumas estirpes MDR, a formulação lipossomal não apresentou qualquer efeito antimicrobiano, nem na concentração mais alta (*E. coli* 26, 1069 e *K. pneumoniae* 256). No entanto, a formulação lipossomal mostrou efeito antimicrobiano noutras estirpes classificadas como MDR (*E. coli* 126, 527, 682, 491-1 e 2), que apesar de não terem sido superiores ou iguais aos valores alcançados pela formulação livre, demonstram o potencial deste tipo de formulações. Em comparação com o estudo de Ögren (2020), os resultados foram semelhantes, exceto a CMI da formulação lipossomal para a estirpe *K. pneumoniae* 256. Nesse estudo, esta estirpe apresentou atividade antimicrobiana na concentração mais elevada que foi testada (120 µg/mL) e no presente estudo não teve qualquer efeito, pois a concentração mais alta testada foi de 24 µg/mL.

Como foi referido anteriormente, uma das vantagens relacionadas com a encapsulação de antibióticos em lipossomas prendem-se com o facto de melhorarem a atividade antimicrobiana contra microrganismos intracelulares e extracelulares. Para além disso, os lipossomas têm sido intensamente estudados pela sua capacidade de ultrapassar as resistências bacterianas (Beaulac et al. 1998; Sachetelli et al. 2000; Mugabe et al. 2006; Alipour et al. 2008). Os mecanismos de resistências são variados, mas a maioria ocorre devido a alteração da permeabilidade da membrana celular, inativação enzimática do fármaco ou expulsão do mesmo por meio de bombas de efluxo. Em relação a estes mecanismos, pensa-se que desempenhem um papel importante quando ocorrem de forma sinérgica, como por exemplo, no caso das bactérias Gram-negativas, tanto a modificação enzimática do fármaco

como a impermeabilidade da membrana externa contribuem para a formação de resistência (Nikaido and Normark 1987; Beaulac et al. 1998).

No presente estudo, a estirpe *E. coli* 26 foi o único em que ambas as formulações não demonstraram qualquer atividade antimicrobiana. Este facto pode estar relacionado com a classificação desta estirpe como ESBL, devido à produção de β -lactamases de espectro alargado. Estas β -lactamases são codificadas por plasmídeos e conferem resistência, através da sua capacidade de hidrólise, à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (Wieler et al. 2011; Prescott 2013). Para além das múltiplas enzimas β -lactamase presentes nas bactérias ESBL, a resistência pode, ainda, aumentar através de mudanças que ocorrem na função das porinas e nos mecanismos de efluxo (Wieler et al. 2011). Assim, por um lado, é possível compreender a inatividade antibacteriana da CTX livre nesta estirpe, mesmo na concentração mais alta. Por outro, era esperado que a CTX encapsulada conseguisse proteção suficiente contra este mecanismo de resistência, mas tal não se verificou, e uma das causas pode estar relacionada com a baixa eficácia de encapsulação do fármaco ou com a necessidade de um tempo de incubação mais prolongado. É importante referir que, ao longo dos tempos, tem-se verificado um aumento da frequência de identificação de ESBL em estirpes *E. coli* de animais de companhia. Para além disso, pensa-se que possa ocorrer transmissão de *Enterobacteriaceae* ESBL entre animais e humanos que convivam na mesma casa (Pomba et al. 2009; Prescott 2013; Ljungquist et al. 2016).

Alguns resultados promissores foram demonstrados utilizando lipossomas com características fusogénicas, por forma a ultrapassar resistências não relacionadas com enzimas (Beaulac et al. 1998), mas também em casos de resistência enzimática (Sachetelli et al. 2000). Um trabalho pioneiro na relação entre a utilização de lipossomas e as resistências bacterianas, realizado por Nacucchio et al. (1985), mostrou que a piperacilina encapsulada em lipossomas (PC: Chol) conferiu proteção contra a hidrólise provocada pela produção de β -lactamases por parte da bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta descoberta é digna de registo, tendo em conta que a piperacilina é um antibiótico inativo contra esta bactéria, embora seja de largo espectro. Além do mais, concluíram que a atividade antibacteriana aumentou devido a uma elevada interação entre a bactéria e o lipossoma e proteção do fármaco das enzimas.

Os estudos que têm como alvo avaliar o desempenho das formulações fusogénicas utilizam, muitas das vezes, as estirpes de *P. aeruginosa*, tendo em conta que esta bactéria é conhecida pela baixa permeabilidade não específica e a presença de sistemas de bombas de efluxo, o que as torna resistentes à maioria dos antibióticos (Sachetelli et al. 2000; Gubernator et al. 2008; Drulis-Kawa et al. 2009). No estudo realizado por Beaulac et al. (1998), os lipossomas encapsulados com tobramicina, em concentração inferior à CMI, mostraram

eficácia bactericida contra *P. aeruginosa*, mas também *E. coli* e *S. aureus*, embora estas duas últimas bactérias tenham membranas celulares estruturalmente diferentes. Igualmente, num outro estudo realizado por Sachetelli et al. (2000), a tobramicina correspondente a apenas 50% da CMI da *P. aeruginosa*, foi encapsulada em lipossomas com propriedades fusogénicas e mostrou eficácia na redução do número de UFC. Os lipossomas utilizados nesse estudo (Sachetelli et al. 2000) são denominados “fluidossomas” devido à sua diferente composição lipídica composta por DPPC (Dipalmitoilfosfatidilcolina) e DMPG (Dimiristoil Fosfatidilglicerol). A associação destes dois lípidos confere uma particular fluidez da membrana, permitindo um aproveitamento máximo das propriedades fusogénicas da formulação.

Tendo em consideração os trabalhos citados, seria de esperar que, no presente estudo, os resultados das CMI da formulação lipossomal tivessem mais sucesso do que o demonstrado. Seria suposto que as características fusogénicas da formulação permitissem uma fusão entre as células bacterianas e o lipossoma, levando a uma elevada quantidade de antibiótico presente no citoplasma, sobrecarregando, assim, as bombas de efluxo da bactéria. Por outro lado, ao promover a fusão entre as duas estruturas, a baixa permeabilidade da membrana externa da bactéria poderia ser alterada através da rutura da mesma (Gao et al. 2018). Como apontado na discussão dos resultados das estirpes suscetíveis, provavelmente a formulação fusogénica não foi suficiente para ultrapassar a repulsão eletrostática que ocorre entre a formulação e as bactérias testadas. Uma solução poderia ser a escolha de “fluidossomas”, como utilizado no estudo supracitado, de forma a que as capacidades fusogénicas pudessem ser potencializadas ao máximo. Para além de melhorar a eficácia de encapsulação, outra forma de melhorar a performance dos lipossomas poderia estar relacionada com a testagem de tempos de incubação mais prolongados, como 48 ou 72 horas, tendo em conta que o antibiótico pode necessitar de mais tempo para se libertar do lipossoma e demonstrar atividade.

Por forma a melhorar a eficácia de encapsulação, o estudo desenvolvido por Alipour et al. (2008) comparou a eficácia de encapsulação de polimixina B utilizando dois métodos de formulação de lipossomas, extrusão e sonicação, e duas formulações diferentes, DPPC/Chol e POPC/Chol. Comprovaram que, em ambas as formulações testadas, a eficácia de encapsulação foi superior no método de sonicação ($32.1 \% \pm 2.43$), sendo que a formulação escolhida foi a DPPC/Chol. Para além disto, concluíram que a atividade antimicrobiana da formulação lipossomal de polimixina B ($16 \mu\text{g/mL}$) superou o antibiótico livre ($64 \mu\text{g/mL}$), o que resultou num aumento da penetração do antibiótico nas células bacterianas, ultrapassando as alterações da permeabilidade e da superfície celular responsáveis pelo desenvolvimento da resistência bacteriana. Assim, como método de preparação dos lipossomas, a escolha da sonicação, em detrimento da extrusão, pode representar uma

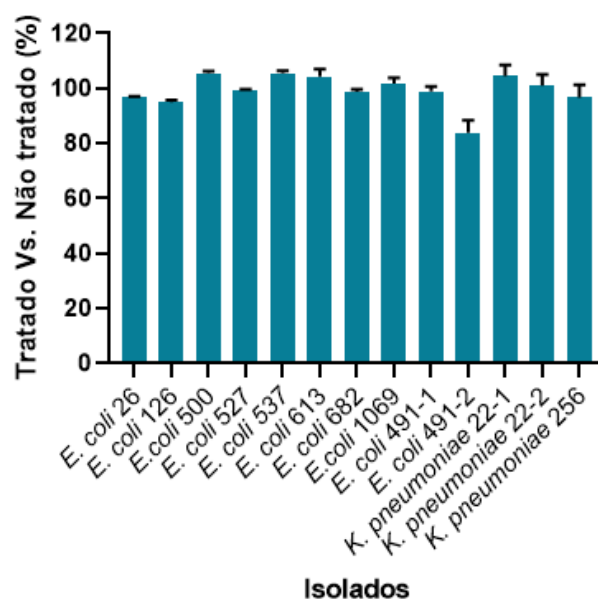
alternativa para melhorar a formulação lipossomal, tendo em conta que é possível atingir uma eficácia de encapsulação superior.

Em suma, existem diversos estudos que utilizam estirpes de *P. aeruginosa* para testar diferentes formulações lipossomais, devido à sua particular resistência relacionada com a alteração da permeabilidade. Pelo contrário, as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, o alvo deste estudo, estão associadas a resistências relacionadas com processos enzimáticos, tornando-se de elevado interesse investigar quais as formulações lipossomais que seriam capazes de ultrapassar esses mecanismos de resistência. Os resultados obtidos no presente estudo, não vão ao encontro de outros estudos nos quais a atividade antimicrobiana da formulação lipossomal foi superior ou equivalente à obtida pela formulação livre. No entanto, os valores de CMI atingidos pela CTX encapsulada podem ser considerados promissores para estudos futuros, em que seja possível manter as características fusogénicas da formulação utilizada, enquanto se aperfeiçoam outros aspetos como aumento do antibiótico incorporado, através do aumento da eficácia de encapsulação. É de referir que apenas foram realizados ensaios *in vitro*, e que o comportamento das formulações lipossomais *in vivo* pode alterar-se, pois quando o lipossoma é libertado no local de infeção o seu poder terapêutico pode apresentar-se melhorado (Sachetelli et al. 2000; Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010). Por último, este estudo demonstrou a importância de serem testados diferentes estirpes com padrões de resistência diversos, pois os resultados das CMI obtidos na estirpe ATCC, estirpes suscetíveis e multirresistentes revelaram-se dispares.

IV. Influência da formulação vazia na atividade antimicrobiana

No decorrer do trabalho prático, foi testada, simultaneamente, a formulação de lipossomas vazios, na concentração máxima de 24 µg/mL. Nesta formulação estão presentes os lípidos responsáveis pela estrutura do lipossoma e o tampão extra-lipossomal. Este teste foi efetuado com o objetivo de compreender se existia interferência desses elementos na atividade bacteriana do fármaco encapsulado. Os resultados podem ser observados no gráfico 19.

Gráfico 19: Viabilidade celular (Tratado Vs. Não tratado - %) das estirpes suscetíveis e MDR, quando submetidas à concentração mais elevada (24 µg/mL) da formulação lipossomal vazia (Lípidos constituintes + Tampão).



Legenda: Eixo y: Viabilidade Celular (%)

Verificou-se que, para todas as estirpes clínicas testadas, os poços que continham o inóculo e o lipossoma vazio não inibiram o crescimento bacteriano, tendo em conta que as percentagens representadas no gráfico 19 se encontram entre os 78 e 109%.

No estudo realizado por Ögren (2020), sucedeu o contrário, tendo em conta que a atividade bacteriana de algumas das estirpes foi inibida, estritamente, pelos constituintes dos lipossomas, nomeadamente, para todas as estirpes de *K. pneumoniae* e para as estirpes *E. coli* 500, 613, 491-1 e 527. Esta oposição de resultados pode estar relacionada com as diferenças entre a composição lipídica das formulações utilizadas nos dois estudos. É possível que algum dos componentes da formulação anterior (PC:PG) tivesse propriedades, ainda não estudadas, que conseguiram influenciar o crescimento bacteriano.

Na literatura encontramos que os lipossomas vazios, ou seja, sem a presença de antibiótico, não promovem qualquer tipo de atividade antibacteriana, permitindo o crescimento bacteriano sem restrições (Drulis-Kawa et al. 2006; Mugabe et al. 2006). Esta informação vai ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Assim, é possível concluir que os componentes inerentes a esta formulação lipossomal, excluindo o fármaco encapsulado, não interferiram na atividade antimicrobiana.

4. Conclusão

As bactérias estão a tornar-se amplamente mais resistentes a uma grande variedade de antibióticos, o que leva a que o tratamento de infeções bacterianas seja encarado como

um problema crescente e um desafio para a maioria dos clínicos, tanto na medicina veterinária como na medicina humana. No seguimento destas questões, o presente estudo testou a encapsulação de antibióticos em lipossomas, para que, no futuro, esta possa ser uma solução viável às resistências aos antibióticos. Mais concretamente, o objetivo foi comparar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da ceftriaxona livre e encapsulada em lipossomas, contra estirpes clínicas de animais de companhia com diagnóstico confirmado de ITU. A maioria destas estirpes clínicas são MDR, como tal, procurou-se compreender se ao encapsular o antibiótico numa formulação lipossomal, seria possível aumentar a atividade antimicrobiana, a fim de ultrapassar os mecanismos de resistência, como a impermeabilidade da membrana externa, mecanismos de efluxo e degradação enzimática. A ceftriaxona foi encapsulada numa formulação lipossomal com propriedades fusogénicas, composta pelos lípidos PC:DOPE:CHEMS e obteve uma eficácia de encapsulação de cerca de 6%.

A CTX encapsulada em lipossomas, quando testada contra as estirpes clínicas, exibiu uma menor atividade antibacteriana, conforme indicado pelos valores de CMI, quando comparada com o antibiótico livre. Para além disso, as resistências não foram ultrapassadas, pois a formulação lipossomal não se demonstrou suficientemente eficaz contra nenhuma das estirpes classificados como MDR. Os lípidos que compõem esta formulação lipossomal foram selecionados devido à sua capacidade de fusão com as membranas das bactérias, especialmente o lípido DOPE, e para que a repulsão electrostática fosse diminuída. Embora esta formulação tenha permitido uma melhor interação entre lipossoma e célula, a eficácia de encapsulação foi baixa, o que limitou a quantidade de fármaco disponível para interagir com a bactéria, diminuindo o seu efeito farmacológico. Desta forma, a eficácia bacteriana da formulação do antibiótico encapsulado não foi aumentada, ainda assim, a formulação lipossomal demonstrou alguma eficácia.

Os lipossomas são promissores por apresentarem baixa toxicidade, permitirem uma proteção ao antibiótico encapsulado e melhorarem o índice terapêutico. No entanto, existe uma dificuldade associada à preparação de antibióticos encapsulados em lipossomas, que se prende com os diferentes métodos de encapsulação disponíveis, a existência de diversos lípidos que podem ser misturados e combinados de variadas formas e com as diferentes propriedades químicas e estruturais dos antibióticos (Gomez and Hosseinidoust 2020). Existem algumas alterações ou ajustes que podem ser feitos à formulação utilizada, sem que se alterem as suas características fusogénicas, para que esta possa ter um melhor desempenho. Pode ser utilizada uma formulação catiónica, já que os lípidos carregados positivamente facilitam a atração electrostática entre a formulação e a bactéria (Drulis-Kawa et al. 2006; Gubernator et al. 2008; Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010), recorrer aos “fluidossomas” (DPPC:DMPG) tendo em conta que as suas características fusogénicas conseguem ser potencializadas (Sachetelli et al. 2000), adicionar íões cálcio à formulação

aniônica (Ma et al. 2013) de forma a diminuir a repulsão eletrostática ao mínimo e maximizar as características fusogênicas inerentes ao lípido DOPE, ou alterar o método de preparação de lipossomas, como por exemplo, utilização da sonicação (Alipour et al. 2008).

Embora os resultados do presente estudo não tenham demonstrado um aumento, *in vitro*, da atividade antibacteriana ao encapsular o antibiótico CTX em lipossomas, em comparação com a formulação livre, existem diversos estudos que comprovam que tais resultados são possíveis de alcançar (Drulis-Kawa et al. 2006; Drulis-Kawa and Dorotkiewicz-Jach 2010; Nicolosi et al. 2010; Gao et al. 2018), incluindo trabalhos em que as formulações lipossomais conseguiram ultrapassar as resistências bacterianas (Beaulac et al. 1996; Sachetelli et al. 2000; Alipour et al. 2008). Contudo, os resultados mostraram-se promissores, na medida em que a formulação lipossomal mostrou atividade antimicrobiana, tanto nas estirpes suscetíveis, como em alguns MDR.

O presente estudo, como muitos outros, decorreu *in vitro*, sendo este o ponto de partida para o desenvolvimento de antibióticos encapsulados em lipossomas que possam ser aprovados para uso clínico. Assim, é necessário avaliar se os resultados obtidos *in vitro* têm reprodutibilidade quando testados em modelos animais (*in vivo*), ou seja, se um antibiótico encapsulado em lipossomas tem capacidade de atingir as concentrações adequadas no local da infecção, de modo a avaliar se, por si só, tem capacidade de tratar uma ITU. Nestas condições o comportamento dos lipossomas pode alterar-se, exemplos disso são os lipossomas carregados positivamente, que têm tendência para formar agregados com as proteínas plasmáticas e a interação do lipossoma com o local onde se desenvolveu uma resposta infecciosa, o pode contribuir para o sucesso da sua utilização. Seguidamente, a formulação lipossomal deveria ser testada na urina, antes de se iniciarem os estudos em modelos vivos, para compreender se as suas propriedades se mantêm.

Concluindo, tendo em conta o crescente número de ITU multirresistentes (Marques et al. 2018), em que os antibióticos convencionais já não representam uma resposta viável de tratamento, a investigação de novas abordagens ao tratamento de infeções bacterianas é imperativa. De entre estas novas estratégias de tratamento, encontram-se os trabalhos desenvolvidos na área das nanopartículas como os lipossomas, onde se inclui o presente estudo. Além do mais, a problemática das resistências não deve ser abordada apenas no que se relaciona com o tratamento, mas também na aplicação de restrições à utilização dos antibióticos, desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais rápidos e controlo de transmissão de infeções.

5. Referências Bibliográficas

- Acar JF, Moulin G. 2012. Antimicrobial resistance: A complex issue. *OIE Rev Sci Tech*. 31(1):23–31.
- Acar JF, Moulin G, Page SW, Pastoret PR. 2012. Antimicrobial resistance in animal and public health: Introduction and classification of antimicrobial agents. *OIE Rev Sci Tech*. 31(1):15–21.
- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. 2013. Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 8(1):1–8.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*. 128(6):1037–1050.
- Alhariri M, Azghani A, Omri A. 2013. Liposomal antibiotics for the treatment of infectious diseases. *Expert Opin Drug Deliv*. 10(11):1-13
- Alipour M, Halwani M, Omri A, Suntres ZE. 2008. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *Int J Pharm*. 355:293–298.
- Anwekar H, Patel S, Singhai AK. 2011. Liposome-as Drug Carriers. *Int J Pharm & Life Sci*. 2(7):945–951.
- Arnold JJ, Hehn LE, Klein DA. 2016. Common questions about recurrent urinary tract infections in women. *Am Fam Physician*. 93(7):560–569.
- Arzanlou M, Chai WC, Venter H. 2017. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem*. 61(1):49–59.
- Baigi SR, Vaden S, Olby NJ. 2017. The Frequency and Clinical Implications of Bacteriuria in Chronically Paralyzed Dogs. *J Vet Intern Med*. 31(6):1790–1795.
- Bambeke FV, Mingeot-Leclercq M-P, Struelens MJ, Tulkens PM. 2008. The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics. *Trends Pharmacol Sci*. 29(3):124–134.
- Banerjee K, Banerjee S, Mandal M. 2015. Liposomes as a Drug Delivery System. *Biol Pharm Appl Nanomater*. 54–86.
- Bangham AD, Horne RW. 1964. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*. 8(5):660–668.
- Baum HV, Marre R. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol*. 295(6–7):503–511.
- Beaulac C, Clément-Major S, Hawari J, Lagacé J. 1996. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 40(3):665–669.
- Beaulac C, Sachetelli S, Lagace J. 1998. In-vitro bactericidal efficacy of sub-MIC concentrations of liposome-encapsulated antibiotic against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 41(1):35–41.
- Bébéar C, Pereyre S, Peuchant O. 2011. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. *Future Microbiol*. 6(4):423–431. doi:10.2217/fmb.11.18.
- [BIO RAD] Bio-Rad Laboratories. 2018. alamarBlue Technical Datasheet. 1–6.
- BioMerieux SA. 2012. Etest Application Guide. London (UK): BioMerieux SA: [accessed 2020 Apr 26]. <https://www.biomerieux-usa.com/etesterv>.

- BioMerieux SA. 2018. Gama de Galerias API. Lisbon (PT): BioMerieux SA: [accessed 2020 Nov 10]. <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-de-galerias-apir>.
- Bleidorn J, Wiese B, Hummers-Pradier E, Gágyor I, Schmiemann G. 2016. Recurrent urinary tract infections and complications after symptomatic versus antibiotic treatment: Follow-up of a randomised controlled trial. *GMS Ger Med Sci*. 14:1–6.
- Brooks BD, Brooks AE. 2014. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 78:14–27.
- Brück A, Abu-Dahab R, Borchard G, Schäfer UF, Lehr CM. 2001. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: Interaction with human alveolar epithelial cells. *J Drug Target*. 9(4):241–251.
- Bush K. 2010. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol*. 13(5):558–564.
- Bush K. 2012. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *OIE Rev Sci Tech*. 31(1):43–56.
- Cambau E, Guillard T. 2012. Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *OIE Rev Sci Tech*. 31(1):77–87.
- Carrillo-Inungaray ML, Trejo-Ramirez JA, Reyes-Munguia A, Carranza-Alvarez C. 2018. Use of Nanoparticles in the Food Industry: Advances and Perspectives. In: Grumezescu AM, Holban AM, editors. *Impact of Nanoscience in the Food Industry*. Elsevier Science; p. 419–444.
- [CDC] Centers for Disease Control and Prevention (US). 2006. Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Georgia (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); [accessed 2020 Sept 18]. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5543a4.htm>
- Chin KCJ, Taylor TD, Hebrard M, Anbalagan K, Dashti MG, Phua KK. 2017. Transcriptomic study of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi biofilm. *BMC Genomics*. 18(1):1–9.
- Choma I. 2007. TLC Separation of Cephalosporins: Searching for Better Selectivity. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 30:2231–2244.
- Christian SS, Christian JS. 1997. The cephalosporin antibiotics. *Prim Care Update Ob Gyns*. 4(5):168–174.
- [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute (USA). 2020. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohen A, Calfee D, Fridkin S, Huang SS, Jernigan JA, Lautenbach E, Oriola S, Ramsey KM, Salgado CD, Weinstein RA. 2008. Recommendations for Metrics for Multidrug Resistant Organisms in Healthcare Settings: SHEA/HICPAC Position Paper. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 29(10):901–913.
- Cohn LA, Gary AT, Fales WH, Madsen RW. 2003. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *J Vet Diagnostic Investig*. 15(4):338–343.
- Colakoglu EC, Haydardedeoglu AE, Alihosseini H, Hayirli A. 2017. Efficacy of single-dose ceftriaxone versus multiple-dose enrofloxacin in dogs with uncomplicated lower urinary tract infection: A randomised clinical trial. *Vet Med (Praha)*. 62(3):125–130.
- Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, Steinbach SML. 2017. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*. 31(3):799–804.

- Davies, J and Davies D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3):417–433.
- Dcosta VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, et al. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 477(7365):457–461.
- Decreto-lei nº 314/2009 de 28 de outubro. Diário da República nº 209/2009 - Série I. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.
- Devansh M, Kumar S. 2015. Cephalosporins: A Review on Imperative Class of Antibiotics. *Inven Rapid Mol Pharmacol.* 2016(1):1–6.
- [DGS, DGAV] Direção Geral da Saúde, Direção Geral de Agricultura e Veterinária. 2019. Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023. Direção Geral de Saúde. 1-25.
- Drawz SM, Bonomo RA. 2010. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 23(1):160–201.
- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. 2010. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm.* 387(1–2):187–198.
- Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Gubernator J, Gula G, Bocér T, Doroszkiewicz W. 2009. The interaction between *Pseudomonas aeruginosa* cells and cationic PC:Chol:DOTAP liposomal vesicles versus outer-membrane structure and envelope properties of bacterial cell. *Int J Pharm.* 367(1–2):211–219.
- Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A. 2006. A comparison of the in vitro antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. *Cell Mol Biol Lett.* 11(3):360–375.
- Ebrahimi S, Farhadian N, Karimi M, Ebrahimi M. 2020. Enhanced bactericidal effect of ceftriaxone drug encapsulated in nanostructured lipid carrier against gram-negative *Escherichia coli* bacteria: Drug formulation, optimization, and cell culture study. *Antimicrob Resist Infect Control.* 9(1):1–12.
- Edwards B, Gould IM. 2012. Antimicrobial stewardship: Lessons from human healthcare. *OIE Rev Sci Tech.* 31(1):135–144.
- Eggertsdóttir A V, Lund HS, Krøntveit R, Sørsum H. 2007. Bacteriuria in cats with feline lower urinary tract disease: A clinical study of 134 cases in Norway. *J Feline Med Surg.* 9(6):458–465.
- Elgart A, Cherniakov I, Aldouby Y, Domb AJ, Hoffman A. 2012. Lipospheres and pro-nano lipospheres for delivery of poorly water soluble compounds. *Chem Phys Lipids.* 165(4):438–453.
- Eloy JO, Petrilli R, Trevizan LNF, Chorilli M. 2017. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 159:454–467.
- [EUCAST] The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect.* 9(8):1–7.
- [EUCAST] The European committee for antimicrobial susceptibility testing of the European society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). 2015. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 5.0, 2015.
- [EUCAST] The European committee for antimicrobial susceptibility testing of the European

- society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). 2019. Reading guide for broth microdilution by EUCAST. Version 1.0, 2019.
- [EUCAST] The European committee for antimicrobial susceptibility testing of the European society of Clinical Microbiology and infectious diseases (ESCMID). 2020. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method. Version 8.0, 2020.
- Fader RC, Davis CP. 1980. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect Immun*. 30(2):554–561.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2008. Pandrug Resistance (PDR), Extensive Drug Resistance (XDR), and Multidrug Resistance (MDR) among Gram-Negative Bacilli: Need for International Harmonization in Terminology. *Clin Infect Dis*. 46(7):1121–1122.
- Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. 2006. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 55:1619–1629.
- Franco A. 2017. Infecção Do Trato Urinário Por *Escherichia Coli* Em Cães E Gatos: Mecanismos Moleculares De Resistência Aos Antibióticos B-Lactâmicos [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV - Universidade de Lisboa.
- Frézard F. 1999. Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian J Med Biol Res*. 32(2):181–189.
- Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. 2018. Nanoparticle-Based Local Antimicrobial Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 176(1):46–57.
- Georgopapadakou NH, Liu FY. 1980. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 18(1):148–157.
- Gerber B, Boretti FS, Kley S, Luluha P, Müller C, Sieber N, Unterer S, Wenger M, Flückiger M, Glaus T, et al. 2005. Evaluation of clinical signs and causes of lower urinary tract disease in European cats. *J Small Anim Pract*. 46(12):571–577.
- Gomez AG, Hosseini Z. 2020. Liposomes for Antibiotic Encapsulation and Delivery. *ACS Infect Dis*. 6(5):896–908.
- Grohmann E, Kohler V, Vaishampayan A. 2019. Acquired Resistance from Gene Transfer. In: Capelo-Martínez J, Igrejas G, editors. *Antibiotic Drug Resistance*. 1st ed. New Jersey (NJ): John Wiley & Sons, Inc.; p. 141–165.
- Gubernator J, Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A. 2008. In vitro Antimicrobial Activity of Liposomes Containing Ciprofloxacin, Meropenem and Gentamicin Against Gram-Negative Clinical Bacterial Strains. *Lett Drug Des Discov*. 4(4):297–304.
- Hibbert-Rogers LCF, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ, Bailey C. 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J Antimicrob Chemother*. 36(1):65–82.
- Hillaireau H, Couvreur P. 2009. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 66(17):2873–2896.
- Hoogevest P, Fahr A. 2019. Phospholipids in Cosmetic Carriers. In: Cornier J, Keck CM, Voorde M Van de, editors. *Nanocosmetics: From Ideas to Products*. Switzerland (SZ): Springer. p. 95–140.
- Huh AJ, Kwon YJ. 2011. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Control Release*. 156(2):128–145.
- Ingvarsson PT, Yang M, Nielsen HMØ, Rantanen J, Foged C. 2011. Stabilization of liposomes

- during drying. *Expert Opin Drug Deliv.* 8(3):375–388.
- Jefferson KK. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 236(2):163–173.
- Jolivet-Gougeon A, Bonnaure-Mallet M. 2019. Bacterial Persistence in Biofilms and Antibiotics. In: Capelo-Martínez J, Igrejas G, editors. *Antibiotic Drug Resistance*. 1st ed. New Jersey (NJ): John Wiley & Sons, Inc; p. 181–210.
- Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 33(3):300–305.
- Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol.* 8(9):634–644.
- Khawaldeh A, Morales S, Dillon B, Alavidze Z, Ginn AN, Thomas L, Chapman SJ, Dublanchet A, Smithyman A, Iredell JR. 2011. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection. *J Med Microbiol.* 60(11):1697–1700.
- Kirby C, Gregoriadis G. 1984. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. *Bio/Technology.* 2(11):979–984.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70(3):337–349.
- Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RJ. 2014. Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci.*(1):29–52.
- Laverman P, Carstens MG, Boerman OC, Dams ETM, Oyen WJG, Van Rooijen N, Corstens FHM, Storm G. 2001. Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(2):607–612.
- Levy SB, Bonnie M. 2004. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat Med.* 10(12S):S122–S129.
- Lin H-A, Yang Y-S, Wang J-X, Lin H-C, Lin D-Y, Chiu C-H, Yeh K-M, Lin J-C, Chang F-Y. 2016. Comparison of the effectiveness and antibiotic cost among ceftriaxone, ertapenem, and levofloxacin in treatment of community-acquired complicated urinary tract infections. *J Microbiol Immunol Infect.* 49(2):237–242.
- Ling G V., Norris CR, Franti CE, Eisele PH, Johnson DL, Ruby AL, Jang SS. 2001. Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8354 canine urinary tract infections (1969-1995). *J Vet Intern Med.* 15(4):341–347.
- Litster A, Moss SM, Honnery M, Rees B, Trott DJ. 2007. Prevalence of bacterial species in cats with clinical signs of lower urinary tract disease: Recognition of *Staphylococcus felis* as a possible feline urinary tract pathogen. *Vet Microbiol.* 121(1–2):182–188.
- Litster A, Thompson M, Moss S, Trott D. 2011. Feline bacterial urinary tract infections: An update on an evolving clinical problem. *Vet J.* 187(1):18–22.
- Livermore D. 2002. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs.* 3:218–224.
- Ljungquist O, Ljungquist D, Myrenås M, Rydén C, Finn M, Bengtsson B. 2016. Evidence of household transfer of ESBL-/pAmpC-producing Enterobacteriaceae between humans and dogs - a pilot study. *Infect Ecol Epidemiol.* 6:31514.
- Lutwyche P, Cordeiro C, Wiseman DJ, St-Louis M, Uh M, Hope MJ, Webb MS, Finlay BB. 1998. Intracellular Delivery and Antibacterial Activity of Gentamicin Encapsulated in pH-Sensitive Liposomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(10):2511–2520.

- Ma YF, Wang Z, Zhao W, Lu TL, Wang RT, Mei QB, Chen T. 2013. Enhanced bactericidal potency of nanoliposomes by modification of the fusion activity between liposomes and bacterium. *Int J Nanomedicine*. 8:2351–2360.
- Madhava P, Prameela DR, Sreedevi B, Rao TM. 2020. Evaluation of autovaccine against mastitis causing *Staphylococcus aureus* in and around Tirupati , Chittoor district, Andhra Pradesh. 9(5):144–151.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18(3):268–281.
- Markey B, Leonard F, Cullinane A, Maguire D. 2013. *Clinical Veterinary Microbiology*. 2nd edition. Missouri (MO): Mosby Ltd.
- Marques C, Belas A, Franco A, Aboim C, Gama LT, Pomba C. 2018. Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *J Antimicrob Chemother*. 73(2):377–384.
- Marques C, Gama LT, Belas A, Bergström K, Beurlet S, Briend-Marchal A, Broens EM, Costa M, Criel D, Damborg P, et al. 2016. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Vet Res*. 12(1):1–17.
- Mcghie J, Stayt J, Hosgood G. 2014. Prevalence of bacteriuria in dogs without clinical signs of urinary tract infection presenting for elective surgical procedures. *Aust Vet J*. 92(1–2):33–37.
- McGuire NC, Schulman R, Ridgway MD, Bollero G. 2002. Detection of occult urinary tract infections in dogs with diabetes mellitus. *J Am Anim Hosp Assoc*. 38(6):541–544.
- Mcmurdo MET, Argo I, Phillips G, Daly F, Davey P. 2009. Cranberry or trimethoprim for the prevention of recurrent urinary tract infections? A randomized controlled trial in older women. *J Antimicrob Chemother*. 63(2):389–395.
- Milla P, Dosio F, Cattel L. 2011. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. *Curr Drug Metab*. 13(1):105–119.
- Morello W, La Scola C, Alberici I, Montini G. 2016. Acute pyelonephritis in children. *Pediatr Nephrol*. 31(8):1253–1265.
- Moyá ML, López-López M, Lebrón JA, Ostos FJ, Pérez D, Camacho V, Beck I, Merino-Bohórquez V, Camean M, Madinabeitia N, et al. 2019. Preparation and characterization of new liposomes. Bactericidal activity of cefepime encapsulated into cationic liposomes. *Pharmaceutics*. 11(2):1–12.
- Mozafari MR. 2010. Chapter 2, Nanoliposomes: Preparation and Analysis. In: Gerald GM, editors. *Liposomes, Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New Jersey (NJ): Humana Press; p. 29-50
- Mugabe C, Halwani M, Azghani AO, Lafrenie RM, Omri A. 2006. Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 50(6):2016–2022.
- Nacucchio MC, Gatto Bellora MJ, Sordelli DO, D'Aquino M. 1985. Enhanced liposome-mediated activity of piperacillin against staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 27(1):137–139.

- Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. 2005. Infectious Diseases Society of America Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Asymptomatic Bacteriuria in Adults. *Clin Infect Dis*. 40(5):643–654.
- Nicolosi D, Scalia M, Nicolosi VM, Pignatello R. 2010. Encapsulation in fusogenic liposomes broadens the spectrum of action of vancomycin against Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 35(6):553–558.
- Nikaido H, Normark S. 1987. Sensitivity of *Escherichia coli* to various β -lactams is determined by the interplay of outer membrane permeability and degradation by periplasmic β -lactamases: a quantitative predictive treatment. *Mol Microbiol*. 1(3):29–36.
- Normand EH, Gibson NR, Reid SWJ, Carmichael S, Taylor DJ. 2000. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. *Prev Vet Med*. 46(4):267–278.
- O'Neill J. 2016. The Review On Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally. *Arch Pharm Pract*. 7(3):110.
- Ögren MLSB. 2020. In Vitro Antimicrobial Activity Of Liposomal Ceftriaxone And Liposomal Amoxicillin And Clavulanic Acid Against Clinical Isolates Of Companion Animals With Urinary Tract Infections [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV - Universidade de Lisboa.
- [OIE] . Office International des Épizooties. 2015. Fact sheets - Antimicrobial resistance. Paris: OIE
- Oliveira M, Dias FR, Pomba C. 2014. Biofilm and fluoroquinolone resistance of canine *Escherichia coli* uropathogenic isolates. *BMC Res Notes*. 7(1):1–5.
- Park JW. 2002. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res*. 4:95–99.
- Paterson DL, Doi Y. 2007. A Step Closer to Extreme Drug Resistance (XDR) in Gram-Negative Bacilli. *Clin Infect Dis*. 45(9):1179–1181.
- Podschun R, Ullman U. 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*. 36(4):250–254.
- Podschun R, Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 11(4):589–603.
- Pomba C, da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martínez-Martínez L. 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(1):327–328.
- Poole K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol Symp Suppl*. 92(1):55–64.
- Prescott JF. 2013. Beta-lactam Antibiotics: Cephalosporins. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell. p. 117–132.
- Punia M, Kumar A, Charaya G, Kumar T. 2018. Pathogens isolated from clinical cases of urinary tract infection in dogs and their antibiogram. *Vet World*. 11(8):1037–1042.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2011a. Chapter 18, Enterobacteriaceae. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. New Jersey (NJ). John Wiley & Sons, Inc. p. 106–123.

- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. 2011b. Chapter 3, Cultivation, preservation and inactivation of bacteria; Bacterial genetics and mechanisms of genetic variation. In: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2nd ed. New Jersey (NJ). John Wiley & Sons, Inc. p. 12–16.
- Rodríguez-Rojas A, Oliver A, Blázquez J. 2012. Intrinsic and Environmental Mutagenesis Drive Diversification and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections. *J Infect Dis.* 205(1):121–127.
- Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. 1970. Two dimensional then layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids.* 5(5):494–496.
- Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 5:1–15.
- Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. 1992. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(1):25–31.
- Sachetelli S, Khalil H, Chen T, Beaulac C, Sénéchal S, Lagacé J. 2000. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1463(2):254–266.
- Segev G, Sykes JE, Klumpp DJ, Schaeffer AJ, Antaki EM, Byrne BA, Yaggie RE, Westropp JL. 2018. Evaluation of the Live Biotherapeutic Product, Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* 2-12, in Healthy Dogs and Dogs with Clinical Recurrent UTI. *J Vet Intern Med.* 32(1):267–273.
- Seguin MA, Vaden SL, Altier C, Stone E, Levine JF. 2003. Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *J Vet Intern Med.* 17(5):622–631.
- Sessa G, Weissmann G. 1968. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res.* 9(3):310–318.
- Shahbaz K. 2017. Cephalosporins: pharmacology and chemistry. *Pharm Biol Eval.* 4(6):234.
- Sharma, A.; Straubinger RM. 1994. Novel Taxol Formulations: Preparation and Characterization of Taxol-Containing Liposomes. *Pharm Res.* 11(6):889–896.
- Sharma A, Sharma US. 1997. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J Pharm.*:123–140.
- Siegel JD, Rhinehart E, Cic RNMPH, Jackson M, Brennan PJ, Steven M, Bell M. 2006. Management of Organisms In Healthcare Settings. *Infect Control.* 1–73.
- Silva M. 2019. Infecção Do Trato Urinário Felino: Prevalência, Caracterização Clínica, Afeções Concomitantes E Adequação Da Antibioterapia Empírica [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV - Universidade de Lisboa
- Solaro R, Chiellini F, Battisti A. 2010. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. *Materials (Basel).* 3:1928–1980
- Stapleton AE, Au-Yeung M, Hooton TM, Fredricks DN, Roberts PL, Czaja CA, Yarova-Yarovaya Y, Fiedler T, Cox M, Stamm WE. 2011. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 52(10):1212–1217.
- Stapleton AE, Dziura J, Hooton TM, Cox ME, Yarova-Yarovaya Y, Chen S, Gupta K. 2012. Recurrent urinary tract infection and urinary *Escherichia coli* in women ingesting cranberry juice daily: A randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc.* 87(2):143–150.
- Storm G, Crommelin DJA. 1998. Liposomes: Quo vadis? *Pharm Sci Technol Today.* 1(1):19–

- Svetoch EA, Stern NJ. 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-A review. *Poult Sci.* 89(8):1763–1768.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J Vet Intern Med.* 25(1):1–13.
- Sykes JE, Westropp JL. 2013. Bacterial Infections of the Genitourinary Tract. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Missouri (MO): Elsevier Inc. p. 871–878.
- Szoka F, Papahadjopoulos D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(9):4194–4198.
- Teichmann-Knorrn S, Reese S, Wolf G, Hartmann K, Dorsch R. 2018. Prevalence of feline urinary tract pathogens and antimicrobial resistance over five years. *Vet Rec.* 183(1):21.
- Thompson MF, Litster AL, Platell JL, Trott DJ. 2011. Canine bacterial urinary tract infections: New developments in old pathogens. *Vet J.* 190(1):22–27.
- Thomsen MK, Svane LC, Poulsen PH. 1986. Canine urinary tract infection. Detection, prevalence and therapeutic consequences of bacteriuria. *Nord Vet Med.* 38(6):394–402.
- Torchilin VP. 1996. Liposomes as delivery agents for medical imaging. *Mol Med Today.* 242–249.
- Torchilin VP. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 4(2):145–160.
- Trautner BW, Darouiche RO. 2004. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control.* 32(3):1–7.
- Valore E V., Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T. 1998. Human β -defensin-1: An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 101(8):1633–1642.
- Way LI, Sullivan LA, Johnson V, Morley PS. 2013. Comparison of routine urinalysis and urine Gram stain for detection of bacteriuria in dogs. *J Vet Emerg Crit Care.* 23(1):23–28.
- Weese JS, Blondeau J, Boothe D, Guardabassi LG, Gumley N, Papich M, Jessen LR, Lappin M, Rankin S, Westropp JL, et al. 2019. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. *Vet J.* 247:8–25.
- Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Hillier A, Lloyd DH, Papich MG, Rankin SC, Turnidge JD, et al. 2011. Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: Antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Vet Med Int.* 1-9
- Weese JS, Page SW, Prescott JF. 2013. Antimicrobial Stewardship in Animals. In: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell. p. 117–132.
- [WHO] World Health Organization. 2015a. Worldwide country situation analysis : response to antimicrobial resistance. *WHO Libr Cat Data.* 25–29.
- [WHO] World Health Organization. 2015b. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *WHO Libr Cat Data.* 1–28.

- Wieler LH, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical sampl. *Int J Med Microbiol.* 301(8):635–641.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2008. Part II Microbial Nutrition, Growth, and Control. In: Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. 7th ed. McGraw Hill. p. 123–128.
- Williams JD. 1999. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. *Int J Antimicrob Agents.* 12(1):7–9.
- Wooldridge KG, Williams PH. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12(4):325–348.
- Wynn SG, Witzel AL, Bartges JW, Moyers TS, Kirk CA. 2016. Prevalence of asymptomatic urinary tract infections in morbidly obese dogs. *PeerJ.* 2016(3):1–10.
- Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev.* 55(1):27– 55.
- Zuidam NJ, Lee SSL, Crommelin DJA. 1993. Sterilization of Liposomes by Heat Treatment. *Pharm Res.* 10(11):1591–1596.

6. Anexos

6.1 Tabelas

Anexo 1: Resultado TSA (difusão em disco) das estirpes 22 e 22-1.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Intermédio
Cloranfenicol	Sensível
Cefalexina	Resistente
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Sensível
Enrofloxacina	Sensível
Ácido Nalidíxico	Sensível
Estreptomicina	Sensível
Sulfametazol + Trimetoprim	Sensível
Tetraciclina	Sensível

Anexo 2: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 26.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, e em cultura pura, <i>Escherichia coli</i> (estirpe ESBL positivo)	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Resistente
Ciprofloxacina	Resistente
Cefalexina	Resistente
Gentamicina	Resistente
Cefotaxima	Resistente
Enrofloxacina	Resistente
Estreptomicina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Sensível
Tetraciclina	Intermédio

Anexo 3: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 126.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Resistente
Ciprofloxacina	Resistente
Cefalexina	Intermédio
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Sensível
Enrofloxacin	Resistente
Estreptomicina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente
Tetraciclina	Intermédio

Anexo 4: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 256.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Intermédio
Ciprofloxacina	Resistente
Cefalexina	Resistente
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Intermédio
Enrofloxacin	Resistente
Estreptomicina	Sensível
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente
Tetraciclina	Intermédio
Amicacina	Sensível
Carbenicilina	Resistente
Ceftazidima	Resistente
Cefoperazona	Resistente
Ofloxacin	Sensível
Piperacilina	Resistente
Tobramicina	Intermédio

Anexo 5: Resultado TSA (difusão em disco) das estirpes 491-1 e 491-2.

Material: Urina (colhida por cistocentese)		
Resultado: Isolou-se, em anaerobiose, dois isolados de <i>Escherichia coli</i>		
Fármaco Testado	Perfil de Resistência (1)	Perfil de Resistência (2)
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Intermédio	Intermédio
Ampicilina	Resistente	Resistente
Cloranfenicol	Sensível	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível	Sensível
Cefalexina	Resistente	Intermédio
Gentamicina	Sensível	Sensível
Cefotaxima	Sensível	Sensível
Enrofloxacina	Intermédio	Sensível
Estreptomicina	Intermédio	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente	Resistente
Tetraciclina	Resistente	Resistente

Anexo 6: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 500.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, e em cultura pura, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível
Cefalexina	Sensível
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Sensível
Enrofloxacina	Sensível
Estreptomicina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Sensível
Tetraciclina	Sensível

Anexo 7: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 527.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Intermédio
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Sensível
Ciprofloxacina	Intermédio
Cefalexina	Intermédio
Gentamicina	Intermédio
Cefotaxima	Sensível
Enrofloxacin	Sensível
Estreptomicina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Sensível
Tetraciclina	Resistente

Anexo 8: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 537.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Intermédio
Ampicilina	Resistente
Ciprofloxacina	Resistente
Cefalexina	Resistente
Gentamicina	Resistente
Cefotaxima	Resistente
Enrofloxacin	Resistente
Estreptomicina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente
Tetraciclina	Intermédio
Nitrofurantoína	Sensível
Amicacina	Resistente
Carbenicilina	Resistente
Ceftazidima	Resistente
Cefoperazona	Resistente
Ofloxacin	Sensível
Tobramicina	Resistente

Anexo 9: Resultado do TSA (difusão em disco) da estirpe 613.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Sensível
Ampicilina	Resistente
Cloranfenicol	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível
Cefalexina	Sensível
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Resistente
Enrofloxacin	Intermédio
Estreptomicina	Sensível
Sulfametazol + Trimetoprim	Sensível
Tetraciclina	Sensível

Anexo 10: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 682.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Sensível
Ampicilina	Resistente
Ciprofloxacina	Sensível
Cefalexina	Sensível
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Intermédio
Enrofloxacin	Intermédio
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente
Tetraciclina	Resistente
Marbofloxacina	Sensível
Amicacina	Sensível
Nitrofurantoína	Intermédio

Anexo 11: Resultado TSA (difusão em disco) da estirpe 1069.

Material: Urina (colhida por cistocentese)	
Resultado: Isolou-se em anaerobiose, em cultura pura, <i>Escherichia coli</i>	
Fármaco Testado	Perfil de Resistência
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	Resistente
Ampicilina	Resistente
Ciprofloxacina	Resistente
Cefalexina	Intermédio
Gentamicina	Sensível
Cefotaxima	Sensível
Enrofloxacina	Resistente
Sulfametazol + Trimetoprim	Resistente
Tetraciclina	Intermédio
Marbofloxacina	Resistente
Amicacina	Sensível
Nitrofurantoína	Sensível

Anexo 12: Base de dados de animais internados na UICB com infecção bacteriana.

ANIMAL	ESPECIE	GEN	IDADE (Anos)	IDADE ESCALAO	RESIS.	TIPO INFECAO	ORIGEM INFECAO	AGENTE	ANTES TSA	APÓS TSA	ANTIBIOTERAPIA	DESFECHO FINAL UICB	FOLLOW UP
DIESEL	CANIDE O	M	9	≥ 7 e < 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	CEFOXITINA	CEFOXITINA	IGUAL	ALTA	EUTANASIA
DINIS	FELIDEO	M	5	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	Klebsiella pneumoniae	CEFOXITINA	CEFOXITINA	IGUAL	ALTA EUTANASIA	SAUDAVEL
PILAS	FELIDEO CANIDE O	M	10	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMICACINA	—	DESCONHECIDA	NA	NA
DESORDEM	CANIDE O	M	7	≥ 7 e < 10	MDR	OSTEOMIELITE	PRIMARIA CONCOMITANTE	Escherichia coli	AMICACINA	FLORFENICOL	MUDOU	ALTA EUTANASIA	SAUDAVEL
ROSA	FELIDEO CANIDE O	F	6	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	MISTO	—	CIPROFLOXACINA	DESCONHECIDA	NA	NA
JUNIOR	CANIDE O	M	6	≥ 3 e < 7	MDR	PERITONITE	PRIMARIA	Escherichia coli	—	FOSFOMICINA	DESCONHECIDA	MORTE	NA
PUK	CANIDE O	M	9	≥ 7 e < 10	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MRSP	MINOCICLINA	AMC	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
CUCA	CANIDE O	F	0,4	< 1	MDR	ITU	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	AMC	GENTAMICINA	MUDOU	ALTA EUTANASIA	SAUDAVEL
JOANA	FELIDEO	F	15	≥ 10	MDR	RINITE	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	MARBOFLOXACINA	MARBOFLOXACINA	IGUAL	NA	NA
TRINCAS	FELIDEO CANIDE O	F	9	≥ 7 e < 10	SENSIVEL	ITU	PRIMARIA	Klebsiella pneumoniae	AMC	MARBOFLOXACINA	MUDOU	ALTA EUTANASIA	SAUDAVEL
ZIG	CANIDE O	M	8	≥ 7 e < 10	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	—	DESCONHECIDA	NA	NA
NINA	CANIDE O	F	7	≥ 7 e < 10	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MISTO	CEFOXITINA	AMC + ENROFLOXACINA	MUDOU	ALTA	CRONICO
MIGAS PIERRE FRANÇOIS RUFUS	FELIDEO	M	3	≥ 3 e < 7	MDR	RINITE	PRIMARIA	MRSP	AMC	MINOCICLINA	MUDOU	ALTA	CRONICO
BORIS	CANIDE O	M	11	≥ 10	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MISTO	CIPROFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	EUTANASIA	NA
ALPHA	CANIDE O	M	0,6	< 1	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	AMC+CLINDAMICINA	MARBOFLOXACINA	MUDOU	ALTA	MELHOR
SANTIAGO	CANIDE O	M	3	≥ 3 e < 7	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	Staphylococcus sp	CIPROFLOXACINA	AMC	MUDOU	ALTA	MELHOR
MATHILDA	CANIDE O	M	12	≥ 10	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MRSP	AMC	AMC	IGUAL	ALTA EUTANASIA	CRONICO
MAX	CANIDE O	F	14	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia Coli	AMC	DOXICICLINA	MUDOU	NA	NA
LUCKY	FELIDEO CANIDE O	M	16	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Klebsiella pneumoniae	—	—	DESCONHECIDA	ALTA	MELHOR
JOSE	CANIDE O	M	10	≥ 10	MDR	FERIDA	PRIMARIA	MISTO	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA	MELHOR
GINNY	CANIDE O	M	7	≥ 7 e < 10	MDR	OTITE	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	AMC	GENTAMICINA	MUDOU	ALTA EUTANASIA	CRONICO
VENTOINHA	CANIDE O	F	11	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA CONCOMITANTE	Escherichia coli	ENROFLOXACINA	—	MUDOU	NA	NA
	FELIDEO	F	15	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA CONCOMITANTE	Escherichia coli	CEFAZOLINA	CEFALEXINA	MUDOU	ALTA	EUTANASIA

GATINHA	FELIDEO	F	9	≥ 7 e < 10	SENSIVEL	ITU	CONCOMITANTE	Escherichia coli	AMC	AMC	IGUAL	ALTA	DESCONHECIDO
SEAMUS	FELIDEO	M	15	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	AMICACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
KAISER	CANIDEO	M	14	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMICACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	SAUDAVEL
Pinóquio	CANIDEO	M	14	≥ 10	MDR	RINITE	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	NA
Aiden	CANIDEO	M	4	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	Pseudomonas aeruginosa	ENROFLOXACINA	CIPROFLOXACINA PRADO FLOXACINA + GENTAMICINA	MUDOU	ALTA	EUTANASIA
Daniel	FELIDEO	M	2	≥ 1 e < 3	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MISTO	MARBOFLOXACINA	—	MUDOU	ALTA	CRONICO
Ruca	FELIDEO	M	9	≥ 7 e < 10	MDR	OTITE	PRIMARIA	MISTO	AMC + MARBOFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
Manel	FELIDEO	M	19	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	DESCONHECIDO Enterobacter cloacae	MARBOFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	SAUDAVEL DESCONHECIDO
Prince	FELIDEO	M	7	≥ 7 e < 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	MARBOFLOXACINA	MARBOFLOXACINA	IGUAL	ALTA	CRONICO
Estrela	FELIDEO	F	13	≥ 10	SENSIVEL	ITU	PRIMARIA	Staphylococcus pseudintermedius	AMC	AMC	IGUAL	ALTA	CRONICO
CARLOTA	CANIDEO	F	8	≥ 7 e < 10	SENSIVEL	FERIDA	PRIMARIA	Klebsiella pneumoniae	AMC	AMC	IGUAL	ALTA	MELHOR
SMURF	FELIDEO	M	4	≥ 3 e < 7	MDR	FERIDA	PRIMARIA	pneumoniae	AMC	MARBOFLOXACINA	MUDOU	ALTA	SAUDAVEL DESCONHECIDO
LOOPY	FELIDEO	M	4	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	Proteus mirabilis	—	—	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
MINI TECO	FELIDEO	M	1	≥ 1 e < 3	SENSIVEL	ITU	CONCOMITANTE	Staphylococcus sp	—	AMC	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO
NIKO	FELIDEO	M	10	≥ 10	SENSIVEL	ITU	CONCOMITANTE	Escherichia coli	AMC	AMC	IGUAL	ALTA	SAUDAVEL
DUQUE	FELIDEO	M	11	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Klebsiella pneumoniae	AMC	AMC	IGUAL	ALTA EUTANASIA	CRONICO
LUNA	CANIDEO	F	16	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	NA
RENATO	FELIDEO	M	1	≥ 1 e < 3	SENSIVEL	ITU	CONCOMITANTE	Staphylococcus chromogenes	—	—	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO
ALBI	FELIDEO	M	4	≥ 3 e < 7	SENSIVEL	ITU	CONCOMITANTE	Staphylococcus pseudintermedius	—	—	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	DESCONHECIDO
CAMILA	FELIDEO	F	17	≥ 10	SENSIVEL	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	AMC	IGUAL	ALTA EUTANASIA	NA
NINA	CANIDEO	F	12	≥ 10	SENSIVEL SUSPEITO	ITU	PRIMARIA	Citrobacter sp.	—	AMC	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	DESCONHECIDO
MIA RIBEIRO	FELIDEO	F	7	≥ 7 e < 10	O	ITU	CONCOMITANTE	DESCONHECIDO	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA EUTANASIA	NA
SUSIE	FELIDEO	F	2	≥ 1 e < 3	MDR	DERMATITE	PRIMARIA	MISTO	PRADO FLOXACINA	PRADO FLOXACINA	IGUAL	ALTA	MELHOR
Baco	FELIDEO	M	5	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	CONCOMITANTE	Escherichia coli	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO
Scarlett	CANIDEO	F	2	≥ 1 e < 3	MDR	FERIDA	PRIMARIA	MRSP	—	CEFAZOLINA	DESCONHECIDA	ALTA	MELHOR
Dali	FELIDEO	M	14	≥ 10	SENSIVEL	ITU	PRIMARIA	MISTO	CEFAZOLINA	CEFAZOLINA	IGUAL	ALTA	SAUDAVEL

Stitch	CANIDE O	M	9	≥ 7 e < 10	MDR	OTITE	PRIMARIA	MISTO	AMC	MARBOFLOXACINA	MUDOU	ALTA EUTANASIA	CRONICO
Yanki	CANIDE O	M	10	≥ 10	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	—	DESCONHECIDA	A	NA
Tiggy	CANIDE O	F	11	≥ 10	MDR	ITU	CONCOMITANTE	MISTO	—	MARBOFLOXACINA	DESCONHECIDA	ALTA	SAUDAVEL
Puma	FELIDEO CANIDE O	M	9	≥ 7 e < 10	MDR	FERIDA	PRIMARIA	MISTO	CEFAZOLINA	MARBOFLOXACINA	MUDOU	MORTE	NA
Cigana	O	F	20	≥ 10	MDR	FERIDA	CONCOMITANTE	Morganella morganii	AMC	AMC	IGUAL	MORTE	NA
TESS	CANIDE O	F	12	≥ 10	MDR	OTITE	CONCOMITANTE	Staphylococcus pseudintermedius	MARBOFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	EUTANASIA
Kalu	FELIDEO CANIDE O	M	12	≥ 10	SENSIVEL	DERMATITE	PRIMARIA	Staphylococcus cohnii	CLINDAMICINA	CLINDAMICINA	IGUAL	ALTA	DESCONHECIDO
BRANQUINHA	CANIDE O	F	3	≥ 3 e < 7	SUSPEITO	BRONQUITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	—	—	DESCONHECIDA	MORTE	NA
DINGO	CANIDE O	M	13	≥ 10	SUSPEITO	BRONQUITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	ENROFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
Estrela	CANIDE O	F	7	≥ 7 e < 10	SUSPEITO	DERMATITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	AMC	ITRACONAZOL	MUDOU	ALTA	CRONICO
FYSSAS	FELIDEO CANIDE O	M	10	≥ 10	SENSIVEL	RINITE	PRIMARIA	Pasteurella multocida	AMC	AMC	IGUAL	ALTA	CRONICO
GREEN	CANIDE O	M	6	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	Staphylococcus aureus	AMPICILINA+METRONIDAZOL	—	DESCONHECIDA	MORTE	NA
LEAH	CANIDE O	F	5	≥ 3 e < 7	SUSPEITO	MENINGITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	—	—	DESCONHECIDA	MORTE	NA
MALHADO	CANIDE O	M	12	≥ 10	SENSIVEL	DERMATITE	PRIMARIA	Staphylococcus pseudintermedius	ENROFLOXACINA	—	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO
NAMI	CANIDE O	F	4	≥ 3 e < 7	MDR	ITU	PRIMARIA	Escherichia coli	AMC	Sulfametoxazol + Trimetoprim	MUDOU	ALTA	EUTANASIA
NINA	CANIDE O	F	9	≥ 7 e < 10	SUSPEITO	PERITONITE	CONCOMITANTE	DESCONHECIDO	AMC+METRONIDAZOL	—	DESCONHECIDA	ALTA	MELHOR
PANTUFA	CANIDE O	M	15	≥ 10	SUSPEITO	FERIDA	PRIMARIA	DESCONHECIDO	AMC+METRONIDAZOL	—	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO
PUPPY	CANIDE O	M	2	≥ 1 e < 3	MDR	RINITE	PRIMARIA	Streptococcus canis	AMC	CEFALEXINA	MUDOU	ALTA	DESCONHECIDO
RIOBA	CANIDE O	F	2	≥ 1 e < 3	SUSPEITO	DERMATITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	AMC	—	DESCONHECIDA	ALTA	CRONICO
RIVER	FELIDEO	M	1	≥ 1 e < 3	SUSPEITO	ENCEFALITE	PRIMARIA	DESCONHECIDO	MARBOFLOXACINA + CEFOTAXIMA	—	DESCONHECIDA	ALTA	MORTE
TARECA	FELIDEO CANIDE O	F	6	≥ 3 e < 7	SENSIVEL	ABCESSO	PRIMARIA	MISTO	MARBOFLOXACINA	MARBOFLOXACINA	IGUAL	ALTA	CRONICO
DORI	O	F	13	≥ 10	SENSIVEL	BRONQUITE	PRIMARIA	Amoxicilina + ácido clavulânico	—	—	DESCONHECIDA	ALTA	DESCONHECIDO

6.2 Comunicação oral no XVI Congresso Internacional Veterinário Montenegro em 21 e 22 de fevereiro de 2020

AN OVERVIEW OF ZOONOTIC DIAGNOSIS IN INFECTIOUS DISEASES ISOLATION HOSPITALIZED PATIENTS

Machado, I. ^{1,3}; Diogo, R. ²; Santos, V. ²; Veloso, R. ²; Gomes, J. ¹; Tavares, L. ^{2,3}; Almeida, V. ^{2,3}; Gil, S. ^{1,2,3}.

¹ Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon.

² Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon. Av. Universidade Técnica, 1300-477, Portugal.

³ CIISA- Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Av. Universidade Técnica, 1300-477, Portugal.

Introduction: Although zoonotic agents pose an occupational threat to veterinarians, in the companion animals' clinic their frequency is underreported, mainly due to lack of accurate data¹. Zoonosis not only affect the health of pets and veterinarians, but also of all hospital staff, pet owners and their families, and have considerable economic impact². This scenario is worsen due to cultural changing bounds with pets, now being considered "family members", and compared to other generations, millennials view their pets as "starter children" as they delay having kids of their own³. This increases like never before the human exposure to virulent products of pet origin. Emerging and re-emerging infectious diseases, and multidrug resistant organisms, grow the need to inform our clients about these risks⁴, and to implement high levels of biosecurity in veterinary hospitals to protect patients, professionals and clients.

Main goals: (I) identify and characterize the main zoonosis recorded among patients admitted at infectious diseases isolation (II) evaluate the impact of the diagnosis of a zoonotic agent on the course of hospitalization and outcome.

Methods: From October 2013 to September 2019, 1061 animals were admitted with a suspicion of infectious disease. An infectious diagnosis (primary or concomitant) was confirmed in 640/1061 cases. Out of these, 18.4% (118/640) were zoonotic agents and 522/640 non-zoonotic. A characterization of the zoonotic infected animals group was made based upon a set of descriptive parameters. The presence of concomitant noninfectious diagnosis, the duration of hospitalization, and the outcome was investigated in both groups.

Results/Discussion: Leptospirosis was the most frequent zoonosis (44.9%, n=53), followed by multidrug resistant bacteria infections with 34.8% (41/118) cases and dermatophytosis with 12.7% (15/118) cases. The remaining zoonotic diagnosis, representing less than 10% each were cryptosporidium, mycobacterium, sarcoptic scabies and a variety of respiratory infections caused by zoonotic bacterial or fungal agents. Regarding animal species, 75.4% (89/118) were

dogs, 23.7% (28/118) cats and 0.9% (1/118) rabbit. 58.5% (69/118) were males and 41.5% (49/118) females. The median age was 7 years. Age ranged from 0.1 to 19 years. Neoplasias led the concomitant diseases with 10.2% (12/118) patients, followed by chronic urinary problems, 8.5% (10/118) and chronic dermatologic problems, 7.6% (9/118). The presence of a non-infectious concomitant disease was identified as a risk factor for the hospitalization of patients with zoonotic diagnosis (OR=1.56; 1.03<OR<2.37; p=0.03). The median hospitalization period was 3 days, ranging from 1 to 21 days. 64.4% (76/118) of the patients were discharged, 3.4% (4/118) were discharged against medical advice, 21.2% (25/118) were euthanized and 11.0% (13/118) died during hospitalization. No significant differences were found among both groups concerning the hospitalization period (p=0.08), the discharge against medical advice (p=0.5) or euthanasia (p=0.3).

Conclusions: A noteworthy proportion of infectious diseases admitted to the isolation unit was potentially zoonotic. The presence of non-infectious concomitant diseases increased the likelihood for hospitalization. The presence of a zoonotic diagnosis did not significantly influence the length of hospitalization neither the decision for discharge or euthanasia.

Bibliography:

1. National Association of State Public Health Veterinarians (2015). Compendium of Veterinary Standard Precautions for Zoonotic Disease Prevention in Veterinary Personnel. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247, 11, 1254-1265.
2. Stull, J.W., Bjorvik, E., Bub, J., Dvorak, G., Petersen, C., Troyer, H.L. (2018). 2018 AAHA Infection Control, Prevention, and Biosecurity Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 54(6), 297-326.
3. Pallota, N. R. (2019). Chattel or child: the liminal status of companion animals in society and law. *Soc. Sci.* 2019, 8, 158; doi: 10.3390/socsci8050158.
4. Canadian Committee on Antibiotic Resistance (2008). Infection Prevention and Control Best Practices for Small Animal Veterinary Clinics. Accessed December 10th, 2019, available at: <https://www.wormsandgermsblog.com/files/2008/04/CCARGuidelines-Final2.pdf>

6.3 Submissão do *Abstract* para o 31º ECCMID 2021 (9-12 julho), Viena – Áustria

***In vitro* antimicrobial activity of liposomal ceftriaxone against clinical strains isolated from companion animals with urinary tract infection**

5a. Mechanisms of action, new compounds, preclinical data & pharmacology of antibacterial agents

Second topic

05. New Antibacterial Agents, PK/PD & Stewardship / 5a. Mechanisms of action, new compounds, preclinical data & pharmacology of antibacterial agentes

Rita Diogo ¹, Maria Ogren ¹, Magda Ferreira ^{1,2}, Solange Gil ¹, Luís Tavares ¹, Joana N.r. Dias ¹, Maria Manuela Gaspar ², Frederico Aires-Da-Silva ¹, Sandra Isabel Aguiar ¹

¹Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa - Lisboa (Portugal), ²Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa - Lisboa (Portugal)

Background: In the face of rising antimicrobial resistance and subsequent absence of effective antibiotics, new approaches are required. A promising strategy to increase the bactericidal efficacy of antibiotics may be achieved through their entrapment in drug carriers, such as liposomes. This strategy may promote antibiotic accumulation at the infection sites by enhancing binding to bacteria, while avoiding systemic exposure.

Methods: In the present study, the *in vitro* antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated ceftriaxone was evaluated and compared against 13 clinical isolates (8 *Escherichia coli* and 3 *Klebsiella pneumoniae*) recovered from companion animals hospitalized in the FMV Infectious Disease Isolation Unit with confirmed diagnosis of urinary tract infection. Ceftriaxone was encapsulated in liposomes, by an active method, using lipid compositions with and without fusogenic properties. The antimicrobial activity was determined through the minimum inhibitory concentration, by the microdilution plate method, whereas the assessment of the bacterial growth was achieved by a resazurin based colorimetric method.

Results: Ceftriaxone was successfully encapsulated in two lipid compositions: phosphatidyl choline:phosphatidyl glycerol (PC:PG) phosphatidyl choline: dioleoyl phosphatidyl ethanolamine and cholesteryl hemisuccinate(PC:DOPE:CHEMS), with higher encapsulation efficiency in the PC:PG formulation (11% vs 6%). The results of the minimum inhibitory concentrations for the two ceftriaxone liposomal formulations were 4 to 16 times higher when compared to the free antibiotic. Nevertheless, both liposomal formulations presented similar

inhibitory activity against 11 of the 13 clinical isolates. Only for 2 multidrug-resistant isolates no antimicrobial activity was observed.

Conclusions: We successfully developed two ceftriaxone encapsulated liposomal formulations. Both formulations presented in vitro antibacterial activity against susceptible and multidrug resistant clinical isolates. This data suggest that liposome-entrapped antibiotics could effectively resolve infections due to *E. coli* and *K. pneumoniae* with different susceptibility patterns. Further investigation is ongoing to understand the differences observed in interaction with clinical isolates namely internalization and stability studies. In addition, other lipid compositions should also be tested by changing liposomes surface charge and membrane fluidity to improve bacteria targeting and fusion.

Keyword 1: Liposome

Keyword 2: Antibiotic

Keyword 3: Antimicrobial resistance

Conflicts of interest

Other support (please specify)

This work was supported by FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia IP, grant UIDB/00276/2020